

**Einfluss einer UVB-Bestrahlung und
einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung
auf die Entstehung und Progression melanozytärer Tumoren
im Hgf-Cdk4^{R24C} Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jennifer Caroline Landsberg
aus Bonn

2011

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Tüting
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Brossart

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.05.2011

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. Thomas Bieber

Meiner Familie,
meinem Patenonkel Burkhard Asbeck
und Elke Asbeck

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Klinik des Melanoms und Bedeutung von UV-Strahlen in der Pathogenese	9
1.2 Analyse molekularer Mechanismen der Melanomentstehung beim Menschen.....	11
1.3 Funktionelle Untersuchungen in genetischen Mausmodellen.....	15
1.4 Immunabwehr von Melanomzellen beim Menschen	16
1.5 Grundlagen der Tumor-Immunologie in Mausmodellen	17
1.6 Hypothesen und Ziele der Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Tierexperimentelle Methoden	22
2.1.1 Mäusstämme, Zucht und Haltung	22
2.1.2 Induktion kutaner Melanome durch UVB bzw. DMBA.....	23
2.1.3 Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung	24
2.2 Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	24
2.2.1 Fixierung, Einbettung und Herstellung von Gewebeschnitten	24
2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	25
2.2.3 Immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz	25
2.3 Durchflusszytometrie	27
2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip	27
2.3.2 Isolation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten	28
2.3.3 Isolation und Aufreinigung von Tumorzellen.....	29
2.3.4 Durchflusszytometrische Färbungen und Analyse.....	29
2.4 Molekularbiologische Methoden	29
2.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe.....	29
2.4.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA	30
2.4.3 Real-Time quantitative PCR	30
2.4.4 DNA Isolation, Amplifikation und Sanger Sequenzierung.....	32
2.5 Statistische Analysen	33
2.6 Verwendete Substanzen	33
2.6.1 Lösungen und Puffer	33
2.6.2 Chemikalien und Reagentien	33
2.6.3 Antikörper Durchflusszytometrie	34
2.6.4 Kits und gebrauchsfertige Reagentien	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Entstehung melanozytärer Tumoren in Hgf und Hgf-Cdk ^{R24C} Mäusen.....	36
3.1.1	Spontane Entstehung von Nävi und Melanomen in Hgf-Cdk4 ^{R24C} Mäusen.....	36
3.1.2	Metastasierungsmuster spontaner Hgf-Cdk4 ^{R24C} Melanome.....	43
3.1.3	Immuntoleranz im Mikromilieu spontaner Hgf-Cdk4 ^{R24C} Melanome.....	44
3.1.4	Invasion metastasierender Melanomzellen in T-Zell-reiche Areale des drainierenden Lymphknoten ohne eine Aktivierung von dendritischen Zellen.....	46
3.1.5	Extramedulläre Hämatopoese und Rekrutierung immaturer myeloider Suppressor-Zellen in die Milz während der Tumorprogression.....	48
3.1.6	Normale Immunzell-Rekrutierung in primäre Hgf-Cdk4 ^{R24C} Sarkome.....	49
3.2	Wirkung einer neonatalen UVB-Bestrahlung auf die Melanomenentstehung und – progression in Hgf-Cdk4 ^{R24C} Mäusen.....	52
3.2.1	Verminderte Latenz der Melanomenstehung nach neonataler UVB-Bestrahlung.	52
3.2.2	Beschleunigtes Wachstum und verstärkte Lungenmetastasierung UVB-induzierter Melanome.....	53
3.2.3	Immuntoleranz im Tumormikromilieu	58
3.3	Analyse der Tumorprogression nach experimentell induzierter, T-Zell-vermittelter Immunüberwachung in primären Hgf-Cdk4 ^{R24C} Melanomen.....	59
3.3.1	Regression primärer Hgf-Cdk4 ^{R24C} Melanome.....	59
3.3.2	Immun-Escape primärer Hgf-Cdk4 ^{R24C} Melanome	60
3.3.3	Proliferation entdifferenzierter Hgf-Cdk4 ^{R24C} Melanomzellen in einem proinflammatorischen Mikromilieu	63
4	Diskussion	66
4.1	Entwicklung von Nävi und Melanomen in genetisch veränderten Mausstämmen	66
4.2	Mechanismen der Melanominduktion durch UVB-Bestrahlung	67
4.3	Abwesenheit lymphozytärer Infiltrate in primär kutanen Melanomen	69
4.4	Immun-Escape nach adoptivem T-Zell Transfer	71
5	Zusammenfassung.....	74
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Danksagung	83
8	Lebenslauf.....	84

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
APC	Adenomatous-polypsis-coli-Protein
Arf	alternatives Lesesraster des INK4a/ARF Lokus (Cdkn2A)
Braf	Serin/Threonin-Proteinkinase Braf (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
BSA	bovines Serumalbumin
DMBA	7,12-dimethylbenz(α)anthracen
cAMP	zyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
Cdk2	Zyklin-abhängige Kinase 2
Cdk4	Zyklin-abhängige Kinase 4
Cdkn2a/p16	Zyklin-abhängiger-Kinase Inhibitor 2A
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
Cxcl2	CXC-Ligand 2
Cy	Cyclophosphamid
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
DC	Dendritische Zelle
EFT2	Translation elongation factor 2
Edn3	Endothelin 3
Egfr	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ERK1/2	Extrazellulär Signalregulierte Proteinkinase 1/2
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G protein-coupled receptor)
Grm1	Glutamatrezeptor, metabotrop 1
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
Hgf	Hepatozytenwachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)
IFN	Interferon
IL	Interleukin

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Jun/Fos	Jun-Protokonkogen (AP1)/Fos oder FBJ Osteosarkom Onkogen
Kit	Tyrosinkinase Kit (auch CD117, Stammzellfaktor-Rezeptor)
MC1R	Melanocortinrezeptor 1 (MC1R)
Mdm2	murine double minute-2
Met	Met Protoonkogen
MEK1/2	Mitogen aktivierte Proteinkinase 1/2 (Mitogen-activated protein kinase 1/2)
MITF	Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
NfkB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NKG2D	aktivierender NK-Zell Rezeptor 2D
NK Zellen	natürliche Killerzellen
NKT Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
Nras	Neuroblastom Ratten Sarkom Protein
p21	CDK-Inhibitor 1 (Inhibitor zyklin-abhängiger Kinasen)
p53	Protein p53
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
poly I:C	Polyinosin-Polycytidylsäure
PTEN	Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog)
Rb	Retinoblastom-Protein
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Kettenreaktion
Scf	Stammzellfaktor
Stat3	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 3
Tbx2	T-box Transkriptionsfaktor 2
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor beta)
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)
UV	Ultraviolett
Wnt	Signalprotein Wnt

1 Einleitung

1.1 Klinik des Melanoms und Bedeutung von UV-Strahlen in der Pathogenese

Das Melanom ist ein bösartiger, invasiv wachsender Tumor von melanozytären Zellen der Haut oder Schleimhaut. Aufgrund der Neigung zur frühzeitigen Metastasierung und der ausgeprägten Resistenz gegenüber heute verfügbaren Behandlungsmethoden ist das Melanom der bösartigste Hauttumor. Es ist für 80% aller Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich. Weltweit sterben jährlich etwa 48 000 Menschen am Melanom (Miller und Mihm, Jr., 2006). Die Inzidenz des Melanoms hat in den letzten Jahren mit einer Steigerungsrate von 3-7% zugenommen und sich innerhalb der letzten 10-15 Jahre verdoppelt (höchste Inzidenzsteigerung aller Krebsarten) (Balch et al., 2009). Klinisch, histopathologisch und molekulargenetisch zeichnet sich das Melanom durch eine große Heterogenität aus. Anhand der verschiedenen Erscheinungsformen unterscheidet man klinisch fünf verschiedene Typen des malignen Melanoms:

- 1) superfiziell spreitende Melanom (SSM): 60%, vorwiegend horizontales Wachstum
- 2) noduläre Melanome (NM) 15-20%: vertikales Wachstum, aggressivste Variante, häufig am Stamm
- 3) Lentigo maligna Melanom (LMM): 5%, fast ausschließlich an sonnenexponierten Hautarealen (Gesicht, Handrücken, Unterarme)
- 4) Akrolentiginöses Melanom (ALM): 2-8%
- 5) Nicht klassifizierbare Melanome: z.B. Amelanotische Melanom

Für die Einschätzung der Prognose und die klinische Stadieneinteilung ist die histopathologische Bestimmung der vertikalen Tumordicke in mm nach Breslow, das Vorhandensein bzw. Fehlen einer oberflächlichen Ulzeration sowie die Anzahl von Mitosen maßgeblich (Balch et al., 2009). Die operative Entfernung ist die Standardtherapie der Behandlung des Primärtumors. Bei einem erhöhten Risiko der Metastasierung (klin. Stadium II, vertikale Tumordicke > 1mm und Stadium wird eine Schildwächter-Lymphknoten Biopsie durchgeführt. Adjuvant kommt bei Patienten nach vollständiger operativer Tumorentfernung im klin. Stadium II/III eine Immuntherapie mit Interferon alpha zur Anwendung. Diese kann das progressionsfreie Intervall verlängern. In einigen Studien konnte auch eine Verlängerung der Gesamtüberlebensrate gezeigt werden (Garbe et al., 2010). Im klin. Stadium IV mit Fernmetastasen ist die vollständige operative Entfernung der Tumoren oft unmöglich. Statistisch versterben 95% dieser Patienten innerhalb von 5 Jahren. Systemische Therapien mit verschiedenen Chemotherapieprotokollen haben bisher nur unbefriedigende Ergebnisse erbracht. Das Alkylanz Dacarbazin wird als Chemotherapeutikum

der ersten Wahl angewendet. Es besitzte eine Ansprechrate von etwa 5-12% und führt zu keiner Verlängerung des Gesamtüberlebens. In den USA ist eine Immuntherapie mit Interleukin-2 im Stadium der Fernmetastasierung zugelassen. Aufgrund der relativen Strahlenresistenz des Melanoms wird eine Bestrahlung von Fernmetastasen meist nur unter palliativen Gesichtspunkten erwogen (Garbe et al., 2010).

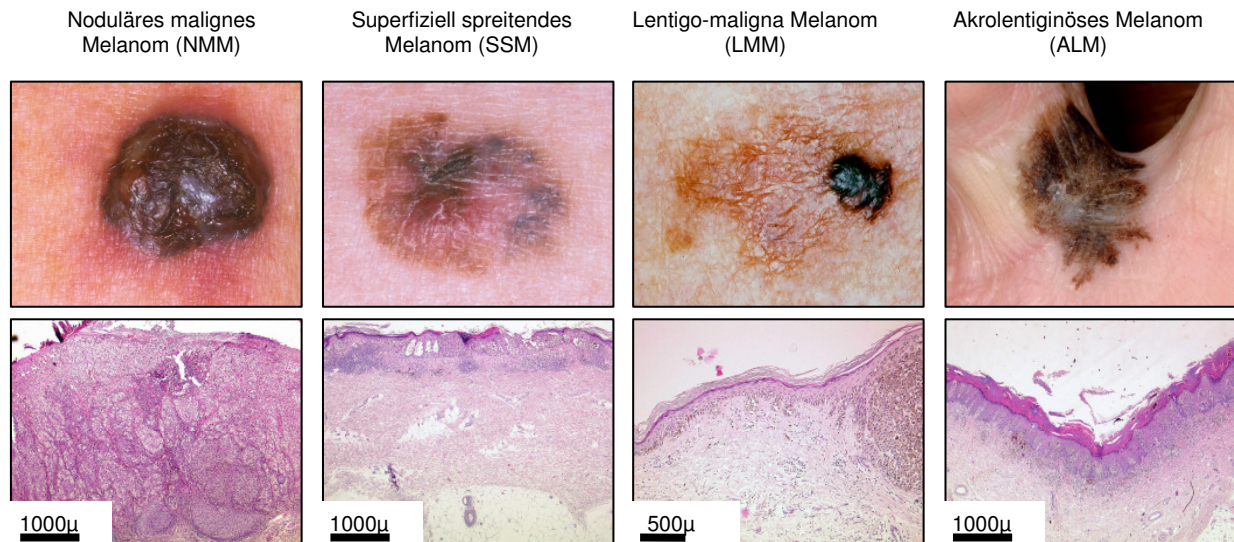


Abb 1. Subtypen des Melanoms. Oben: Repräsentative makroskopische Aufnahmen. Unten: Korrespondierende Mikroskopie (H&E gefärbt).

Epidemiologische Studien konnten zeigen dass Menschen, die in Ländern mit hoher UV-Strahlenbelastung leben und einen hellen Hauttyp mit hoher Sonnenbrandempfindlichkeit haben, die höchste Melanominzidenz aufweisen (Whiteman und Green, 1999). Intermittierende intensive UV-Exposition während der Kindheit wird mit der Entwicklung von Nävi in Zusammenhang gebracht, weil Melanozyten mit geringem Pigmentgehalt und geringer DNA-Reparaturkapazität als besonders anfällig für UV-induzierte Mutationen gelten (Gilchrest et al., 1999). Diese Hypothese könnte Daten von Studien erklären, in denen eine direkte Korrelation zwischen Sonnenexposition und Nävi-Anzahl in Schulkindern gezeigt wurde (Oliveria et al., 2006). Der genaue Mechanismus, wie UV-Strahlung und individuelle genetische konstitutionelle Risikofaktoren zur Melanompathogenese beitragen ist nicht im Detail verstanden.

Der biologische Effekt von UV-Strahlung auf Zellen in der Haut wurde in vitro und in vivo in Mäusen und im Menschen untersucht (von Thaler et al., 2010). UV-Strahlung kann DNA-Mutationen hervorrufen, die eine zentrale Rolle bei der malignen Transformation haben können. UVB-Bestrahlung führt zu zwei typischen DNA-Schäden: Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) zwischen benachbarten Thymin oder Cytosinresten und 6-Pyrimidin 4-pyrimidon-Photoprodukte

(6-4PP) (Matsumura und Ananthaswamy, 2004). CPDs lassen sich weniger effizient reparieren und sind damit häufiger und stärker karzinogen. DNA-Mutationen mit CT-T und CC-TT Transition werden als „UVB Signatur-Mutationen“ bezeichnet. Zusätzlich induzieren sowohl UVA als auch UVB-Bestrahlung oxidative DNA-Schäden wie z.B. 8-Oxoguanine. Die geschädigten Zellen reagieren auf die DNA-Schäden in der Regel mit einem Zellzyklusarrest, gefolgt von einer DNA-Reparatur oder der Einleitung von Apoptose. Oxidativer Stress aktiviert zusätzlich den MAPK-Kinase Signalweg, der das Überleben der Zellen positiv beeinflusst. In vivo, fördert UV-Bestrahlung die parakrine Sekretion von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen in der Haut, die Vorläuferzellen zur Proliferation stimulieren, Leukozyten rekrutieren und eine transiente immunsuppressive angeborene Immunantwort induzieren. Diese regenerative Entzündungsantwort wird als mögliche Ursache für das Überleben und die Ansammlung von mutierten Apoptose resistenten Melanozyten diskutiert, die im Verlauf Auslöser der Melanomenstehung sein können (Oliveria et al., 1999).

1.2 Analyse molekularer Mechanismen der Melanomentstehung beim Menschen

In den letzten 15 Jahren wurden zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen beschrieben, die zur Melanomentstehung und -progression beitragen. Dabei hat sich gezeigt, dass die meisten humanen Melanome eine Aktivierung des Ras-Raf Signaltransduktionswegs sowie einen Funktionsverlust der Tumor Suppressorgene p16^{INK4a}-Rb und/oder Arf-p53 aufweisen. Dies führt zu einer Aufregulation von Wachstumsfaktor-Signalen und zu einer Störung der Zellzyklus-Kontrolle am G1 Kontrollpunkt. Ungezügelt proliferierende, entartete Melanozyten können sich aus dem ursprünglichen Zellverband migrieren und sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasieren.

Die häufigsten Veränderungen des Ras-Raf Signaltransduktionswegs sind somatische Mutationen in den beiden Schlüsselgenen Braf und Nras, die in bis zu 90% der Melanome gefunden werden (Curtin et al., 2005). Eine Nras Mutation in einer humanen Melanomzelle wurde erstmals 1984 durch *in vitro* Transformationsexperimente mit genomischer Tumor-DNA in NIH3T3 Zellen beschrieben (Padua et al., 1984). Die viel häufigere Braf Mutation wurde erst 2002 in einer genomischen Sequenzierungsstudie gefunden (Davies et al., 2002). Die Braf-Mutation beruht dabei meistens auf einer singulären Substitution (T => A) mit Austausch der Aminosäure Valin durch die Aminosäure Glutamat (V600E) und führt zu einer erhöhten Kinase-Aktivität, die zu einer Aktivierung von Erk und einer von Ras unabhängigen Zellproliferation führt. Aktivierende

Braf-Mutationen in Melanomen werden besonders an Haut mit intermittierender Sonnenexposition gefunden, selten jedoch an Hautarealen die dauernd oder gar nicht der Sonne ausgesetzt sind (Maldonado et al., 2003; Edwards et al., 2004). Diese Daten sprechen trotz Abwesenheit der klassischen UV-induzierten C=>T oder CC=>TT Mutationen dafür, dass UV-Strahlung eine wesentliche Ursache von Braf-Mutationen darstellt. Interessanterweise finden sich auch in den meisten melanozytären Nävi Braf-mutiert Zellen (Pollock et al., 2003; Yazdi et al., 2003).

Eine Aktivierung des Ras-Raf Signaltransduktionswegs kann auch durch Mutationen oder genomische Amplifikationen der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit entstehen. Diese Veränderungen findet man vor allem bei den selteneren akrolentiginösen Melanomen und Schleimhaut-Melanomen (Curtin et al., 2006). Alternativ wurde die vermehrte autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren beschrieben, die zu einer autokrinen Stimulation des Ras-Raf Signalwegs beiträgt. Hierbei spielt unter anderem die Interaktion zwischen dem Hepatocyte growth factor (Hgf) und seiner Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met eine wichtige Rolle, die bei humanen Melanomzellen nicht nur die Proliferation sondern auch die Motilität fördert (Halaban et al., 1992; Li et al., 2001). Hgf wird als inaktives monomeres Polypeptid (90 kDa) sezerniert und durch Serinproteasen (z.B. gewebespezifische Plasminogenaktivatoren, Koagulationsfaktor XIIa) in eine 69-kDa alpha- und eine 34kDa beta-Kette gespalten. Eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Ketten führt zum aktiven Hgf, als heterodimeres Glykoprotein. C-Met ist eine transmembrane Tyrosinkinase bestehend aus einer 145-kD β - und einer 50kD α -Untereinheit, die durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden (Maun et al., 2010). Erhöhte c-Met Expressionslevel wurden in humanen Melanomen im Vergleich zu Nävi gefunden, die möglicherweise auf eine Amplifikationen der chromosomalen Region 7q31-34 zurückzuführen sind (Natali et al., 1993). Im Serum von Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen finden sich gelegentlich auch erhöhte Hgf Konzentrationen.

Die häufigsten Veränderungen der Tumor Suppressorgene p16^{INK4a}-Rb und Arf-p53 betreffen chromosomale Deletionen des Chromosoms 9, die erstmalig in karyotypischen Analysen von kultivierten Melanomzellen 1988 beschrieben wurden (Cowan et al., 1988). Die genomische Region 9p13-p22 wurde auch als Suszeptibilitäts-Lokus in Familien mit erblicher Melanomentstehung identifiziert (Cannon-Albright et al., 1993). Weiterführende Studien wiesen auf eine Bedeutung des Cdkn2a Gens in dieser Region hin (Kamb et al., 1994; Hussussian et al.,

1994). Kurz zuvor hatte man erkannt, dass ein 16 KD schweres protein (p16) an die Zyklin-abhängige Kinase 4 (Cdk4) bindet und die Assoziation mit Zyklin D1 und den Eintritt in den Zellzyklus am G1 Kontrollpunkt verhindert (Beach et al., 1993). Die Entdeckung einer p16-insensitiven, onkogenen Variante des Cdk4 Proteins in einem sporadischen Melanom mit der Hilfe von tumor-spezifischen T-Zellen (Wolfel et al., 1995) und in einer Melanomfamilie (Zuo et al., 1996) mit Mutationen in der p16 Bindungsdomäne im Codon 24 (R24C bzw. R24C) erbrachte einen weiteren Hinweis auf die kritische Bedeutung der p16-Cdk4 Interaktion für die Melanomentstehung.

Weiterführende Studien zeigten, dass das Cdkn2a Gen für 2 Proteine kodiert, die beide das Wachstum und Überleben von Melanomzellen beeinflussen: p16^{INK4A} (Inhibitor of cyclin-dependent kinases 4a) und p14^{ARF} (Alternative Reading Frame). p16^{INK4A} hemmt die Cdk4-vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins und induziert so einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. p14ARF destabilisiert Mdm-2 (mouse double minute 2 protein), einen Inhibitor von p53, und fördert dessen Abbau über das Proteasom. Dadurch kann p53 stabilisiert werden und als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklus-hemmenden (z.B. p21^{Waf1/Cip1}) und Apoptose-fördernden Genen (z.B. Bax, Puma, APAF-1) wirken (Kamijo et al., 1998; Stott et al., 1998). Heute sind zahlreiche Keimbahn-Mutationen und Deletionen des Cdkn2a Gens in vielen Patienten mit familiären Melanomen beschrieben. In sporadischen Melanomen kommt es sehr häufig zu chromosomalen Deletionen des Cdkn2a Gens (Soufir et al., 1998; Walker et al., 1998). Mutationen des Cdk4 Gens sind sehr selten. Eine Subgruppe von sporadischen Melanomen zeigt eine Amplifikation des Cdk4 Gens (Soufir et al., 1998; Walker et al., 1998; Curtin et al., 2005).

Abb. 2: Genetische Veränderungen beim Melanom: Vereinfachte Darstellung der in der Melanomentstehung beteiligten Signalwege. Grün markierte Faktoren sind mit aktivierenden Mutationen oder Amplifikationen beschrieben, rot markierte Faktoren mit inaktivierenden Mutationen oder Deletionen. APC: Adenomatous-polypsis-coli-Protein; Arf: alternatives Leserahmen des INK4a/ARF Locus (CDKN2A), Braf: Serin/Threonin-Proteinkinase Braf (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1); cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; Cdk2: Zyklus-abhängige Kinase 2; Cdk4: Zyklus-abhängige Kinase 4; Cdkn2a/p16: Zyklus-abhängiger-Kinase Inhibitor 2A; Cxcl2: CXCL-Ligand 2; EFT2: Translation elongation factor 2; Edn3: Endothelin 3; Egfr: Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor; ERK1/2: Extrazellulär Signalregulierte Proteinkinase 1/2; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; Grm1: Glutamaterezeptor, metabotrop 1; GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3; Hgf: Hepatozytenwachstumsfaktor; Jun/Fos: Jun-Protokonkogen (AP1)/Fos; Kit: Tyrosinkinase Kit (auch CD117, Stammzellfaktor-Rezeptor); MC1R: Melanocortinrezeptor 1; Mdm2: murine double minute-2; Met: Met Protoonkogen; MEK1/2: Mitogen aktivierte Proteinkinase 1/2; MITF: Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor ; NfκB: nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells; Nras: Neuroblastom Ratten Sarkom Protein; p21: CDK-Inhibitor 1 (Inhibitor zyklus-abhängiger Kinasen); p53: Protein p53; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PTEN: Phosphatase and Tensin homolog; Rb: Retinoblastom-Protein; Scf: Stammzellfaktor; Tbx2: T-box Transkriptionsfaktor 2; Tgf: Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor); Wnt: Signalprotein Wnt.

1.3 Funktionelle Untersuchungen in genetischen Mausmodellen

Die Bedeutung von Hgf für die Melanomentstehung konnte von der Arbeitsgruppe um G. Merlino in Hgf-transgenen Mäusen eindrucksvoll gezeigt werden. In diesen Mäusen steht das Hgf Gen unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promoters. Die erhöhten Hgf Spiegel führen dazu, dass Melanozyten nicht nur in den Haarfollikeln – wie bei den meisten Mausstämmen – sondern auch in der interfollikulären Epidermis lokalisiert sind. Diese Verteilung führt in pigmentierten C57BL/6 Stamm zu einem „dark skin phenotype“ und kommt der humanen Haut am nächsten (Hirobe, 1995). Die spontane Entwicklung von Melanomen in 22% der Mäuse zeigte eindrucksvoll die Bedeutung von Hgf für die melanozytäre Transformation. Melanome in Hgf Mäusen weisen häufig Metastasen in Lymphknoten und viszerale Organe auf, da Hgf die Motilität der Zellen unterstützt (Recio et al., 2002). Eine neonatale UVB-Bestrahlung führt dazu, dass Melanome früher entstehen und bei fast 90% der Hgf-Mäuse auftreten. Eine UVB-Bestrahlung im Erwachsenenalter zeigte keine Veränderung der Melanomentstehung (Noonan et al., 2001).

Transgene Mäuse die aktiviertes H-Ras unter der Kontrolle eines Tyrosinasepromotors exprimieren entwickeln multiple Nävi, jedoch keine Melanome, so dass H-Ras alleine in vivo nicht zur Melanomenstehung beitragen kann (Powell et al., 1995). Ink4a-defiziente Mäuse, in denen p16^{Ink4a} und p19^{arf} deletiert ist, versterben frühzeitig an Lymphomen und Sarkomen ohne dass bis zu diesem Zeitpunkt die Mäuse an melanozytären Tumoren erkrankt sind (Serrano et al., 1996). Ink4a-defiziente Mäuse, die zusätzlich aktiviertes H-Ras oder N-Ras in den Melanozyten exprimieren entwickeln jedoch Melanome und demonstrieren die Bedeutung des Ras-Raf-Signalweges und der Zellzykluskontrolle in der Melanomenstehung (Chin et al., 1997; Broome et al., 1999; Ackermann et al., 2005). Die zentrale Rolle von aktiviertem H-Ras nicht nur bei der Melanomenstehung sondern auch bei der Tumorphyse konnte in H-Ras-induzierbaren-Ink4a-defizienten Mäusen gezeigt werden, in denen die Herunterregulation von H-Ras zur Regression von etablierten Tumoren führte (Chin et al., 1999). Transgene Hgf-Mäuse auf dem Ink4a-defizienten Hintergrund entwickeln nach einer einmaligen neonatalen UVB-Bestrahlung verstärkt Melanome. Die frühzeitige Entwicklung von Sarkomen und Lymphomen verhindert in diesen Mäusen die Beobachtung der Melanomenstehung ohne den Einfluss von UVB (Recio et al., 2002).

Mäuse mit einem selektiven Knockout von p16^{Ink4a} entwickeln neben Lymphomen und Sarkomen auch spontan Melanome (Sharpless et al., 2001). Cdk4^{R24C} knockin Mäuse entwickeln nach Behandlung mit dem Karzinogen DMBA und dem Tumorpromotor TPA in bis zu 70% Nävi und multiple progressiv wachsende, ausschließlich dermal gelegene, stark pigmentierte Melanome (Sotillo et al., 2001).

Hgf-transgene und Cdk4^{R24C} Knockin Mäuse wurden von unserer Arbeitsgruppe auf den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. Durch die Kombination der Cdk4^{R24C} Mäuse mit der transgenen Überexpression von Hepatocyte growth factor (Hgf) als Wachstumsfaktor für Melanozyten ist es gelungen, das autochthone Maus-Melanom-Modell entscheidend zu verbessern. Unter einer klassischen Zwei-Schritt-Karzinogenese-Behandlung (DMBA und TPA) entwickelten Hgf-Cdk4^{R24C} C57BL/6 Mäuse nach wenigen Wochen rasch wachsende, autochthone Melanome in der Haut, die spontan in Lymphknoten und Lungen metastasierten. Hgf C57BL/6 Mäuse waren im Vergleich viel resistenter gegenüber der Karzinogen-Wirkung (Tormo et al., 2006b).

1.4 Immunabwehr von Melanomzellen beim Menschen

Spontane Regressionen kutaner Melanome in Assoziation mit histopathologisch nachweisbaren Immunzell-Infiltraten können immer wieder bei Melanompatienten nachgewiesen werden (Kalialis et al., 2009). Ein weiteres klinisches Phänomen ist das gelegentliche Auftreten von Vitiligo bei Melanompatienten (Le Gal et al., 2001). Diese Beobachtungen haben schon vor vielen Jahren das Interesse von Tumor-Immunologen geweckt. Beim Melanom konnte früh im menschlichen System bestätigt werden, dass zytotoxische T-Zellen (CTL) in der Lage sind, Tumorzellen spezifisch zu erkennen und zu zerstören (Wolfel et al., 1989). Die oben beschriebene Identifikation der onkogenen Cdk4 Mutation sowie die Entdeckung der MAGE Proteine mit Hilfe von zytotoxischen T-Zellen belegen eindrucksvoll, dass das erworbene Immunsystem in der Lage ist, den Prozess der malignen Transformation Antigen-spezifisch zu erkennen (Wolfel et al., 1995; van der Bruggen et al., 1991; Boon et al., 2006). Damit wurde das Melanom zu einer wichtigen Erkrankung für die Erforschung der Regulation von zellulären Immunantworten gegen Tumoren beim Menschen.

Eine Reihe von Studien untersuchte die prognostische Bedeutung einer T-Zell-Infiltration in primären Melanomen. Dabei zeigte sich, dass Melanompatienten mit einer starken lymphozytären Infiltration des Primärtumors ein bis zu dreifach längeres Überleben aufweisen als Patienten mit

Primärtumoren in denen sich kaum T-Zellen befanden. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Korrelation von Melanom-infiltrierenden T-Zellen und der Lymphknotenmetastasierung gefunden werden (Clark, Jr. und Tucker, 1998; Cassileth et al., 1988; Mihm, Jr. et al., 1996).

Bis heute ist unklar zu welchem Zeitpunkt der Tumorenstehung bzw. –progression es zur Infiltration und Stimulation von T-Zellen kommt, unter welchen Bedingungen eine Immunantwort ausbleibt und in wie weit die Art der malignen Transformation mit der Immunzellinfiltration korreliert. Interessanterweise zeigen Nävi in der Regel keine Immunzellinfiltration, auch wenn sie häufig aktivierende Mutationen im Braf-Protein (V600E) aufweisen, die in Melanozyten ein onkogen-induziertes Seneszenz-Programm induzierten, das mit der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 und 8 assoziiert wird. Dagegen findet man bei etwa 2/3 Drittel der humanen Melanome Immunzellinfiltrate (Taylor et al., 2007; Al-Batran et al., 2005a).

1.5 Grundlagen der Tumor-Immunologie in Mausmodellen

Die Beobachtungen der Abstoßung von transplantierten Virus- und Karzinogen-induzierten Tumorzellen in Inzucht-Mausstämme führte in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts zur Immunosurveillance-Theorie von Sir Macfarlane Burnet und Lewis Thomas (Burnet, 1970; BURNET, 1957). Nach dieser Theorie kommt es laufend zur Entartung von Zellen, die jedoch in der Regel durch das Immunsystem insbesondere durch T-Zellen eliminiert werden. Erst beim Versagen der immunologischen Kontrolle entsteht ein klinisch sichtbares Tumorwachstum. Gegen dieses Konzept der immunologischen Überwachung sprach zunächst, dass spontane Karzinome bei Thymus-defizienten Mäusen im Vergleich zu syngeneten, immunkompetenten Mäusen vom Wildtyp in gleicher Häufigkeit auftraten (Stutman und Shen, 1978). Thymus-defiziente Mäuse besitzen jedoch noch funktionell aktive T- Zellen und NK-Zellen und sind somit nicht komplett immundefizient (Ikehara et al., 1984).

Die fehlende Immunogenität nach Transplantationen von spontan aufgetretenen Tumoren in immunkompetenten Mäusen stellte die physiologische Bedeutung von transplantierten Virus- und Karzinogen-induzierten Tumorzellen zur Analyse der Tumor-Immunzell-Interaktion in Frage (Hewitt et al., 1976; Klein und Klein, 1977). Die Arbeitsgruppe von Boon konnte jedoch eine auf T-Zellen basierende Immunerkennung bei spontanen, wenig immunogenen Maus-Tumoren durch Mutagenese-Experimente und Immunselektion *in vitro* zeigen (Boon und Maryanski, 1985). Als

erstes von T-Zellen erkanntes „Cancer-Testis“ Tumor-Antigen in der Maus wurde P1A molekular identifiziert. Die Entdeckung des ersten humanen Tumor-Antigens „MAGE“ (Melanoma-associated antigen) im humanen Melanom wurde durch Übertragung der in der Maus etablierten Strategien zur Charakterisierung von Tumor-spezifischen T-Zellen ermöglicht. MAGE ist ein „Cancer-Testis“ Antigen, das außer in malignen Tumoren nur im Hodengewebe natürlicherweise exprimiert wird (van der Bruggen et al., 1991).

In den neunziger Jahren erschienen zahlreiche Publikationen in denen gezeigt wurde, dass Mäuse mit unterschiedlichen Immundefekten nach Karzinogen-Behandlungen verstärkt Tumoren entwickeln. Diese Beobachtungen trugen zur Renaissance der Immunosurveillance Theorie bei. (Dighe et al., 1994; Kaplan et al., 1998; Street et al., 2002; Shankaran et al., 2001). Die unterschiedliche Immunogenität von Methylchloranthren (MCA)-induzierten Sarkomzellen in Transplantationsversuchen führte zu der Theorie, dass das Immunsystem nicht nur an der frühen Tumorentstehung beteiligt ist, sondern auch die Tumorentwicklung mitprägt (Shankaran et al., 2001). 2004 wurde daher vorgeschlagen den Begriff „Immunosurveillance“ (Immunüberwachung) durch „Immunoediting“ (Immunprägung) zu ersetzen (Dunn et al., 2004). Dabei stellt man sich diese Prägung als Resultat dreier Prozesse vor: Eliminierung, Gleichgewicht und „Escape“ (Elimination, Equilibrium and Escape = The three Es of cancer Immunoediting). Die Eliminationsphase repräsentiert das klassische Konzept der Immunosurveillance mit der Abtötung von Tumorzellen durch Effektor-Immunzellen. In der Gleichgewichtsphase erfolgt neben der Zerstörung von Tumorzellen eine Selektion weniger immunogener Tumorzellen, die einem Angriff des Immunsystems erschweren oder verhindern. Dabei kann dieser Prozess über Jahre verlaufen. In der „Escape“ Phase entziehen sich Tumorzellen, durch genetische und epigenetische Veränderungen der immunologischen Kontrolle und wachsen zu klinisch sichtbaren Tumoren heran (Shankaran et al., 2001; Dunn et al., 2002). Nach der Immunoediting-Hypothese verhindert der Tumor die T-Zell Erkennung über den Verlust seiner Immunogenität.

Die experimentelle Analyse der Interaktion von T-Zellen mit Melanomzellen in Mäusen wurde zunächst durch die Tatsache erschwert, dass Mäuse nur sehr selten sponane Melanome entwickeln und lange Zeit keine Melanom-spezifischen T-Zellen bekannt waren. In den 80er Jahren konnte die wenige immunogene B16-Melanomzell-Linie aus einem spontan entstandenen Melanom einer C57BL/6 Maus etabliert werden, die in Wildtyp-Mäusen nach Transplantation zu

Melanomen führt (Fidler und Nicolson, 1976). Dieses Modell ermöglichte die Identifikation der melanomspezifischen T-Zell-Antigene Trp2 (Bloom et al., 1997) und gp100 (Overwijk et al., 1999). Dadurch konnten zahlreiche Vakzinierungs-Strategien mit einem klinisch relevanten Antigen experimentell evaluiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Selbst-Toleranz in Mäusen mit transplantierten B16-Melanomen durch Vakzinierung mit rekombinanten Viren, aktivierten DC oder immunstimulierenden Nukleinsäuren durchbrochen werden kann (Tormo et al., 2006a; Steitz et al., 2002).

Die Erzeugung von T-Zell-Rezeptor-transgenen (TZRtg) Mäusen ermöglichte ein genaueres Studium der Interaktionen zwischen Melanomzellen und T-Zellen *in vivo* in Mäusen mit fortgeschrittenen Tumor-Transplantaten. Für das Melanom entwickelte die Arbeitsgruppe von Restifo den Pmel-1 Mausstamm bei dem ein transgener T-Zell-Rezeptor von den meisten CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert wird. Diese T-Zellen erkennen das an H2-D^b-gebundene Peptid KVPRNQDWL, entsprechend Aminosäure 22 bis 35, des gp100/Pmel-17 Proteins. Pmel-1 TZRtg T-Zellen können B16 Melanomzellen, die natürlicherweise gp100 exprimieren, *in vitro* und *in vivo* zerstören (Overwijk et al., 2003).

Durch die Entwicklung von Mausmodellen, in denen spontan primäre Tumore auftreten, können nun spontane und Vakzin-induzierten Immunantworten während der natürlichen Tumorprogression analysiert werden. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine genetische Prime-Boost Immunisierung gegen Trp2 in Cdk4^{R24C} Mäusen keine wesentliche Zerstörung der autochthonen melanozytären Tumoren in der Haut induzierte, was als Ausdruck einer peripheren und möglicherweise tumorspezifischen Immuntoleranz gedeutet werden kann (Steitz et al., 2006).

Tumor-Immunprägung (Cancer Immunoediting)

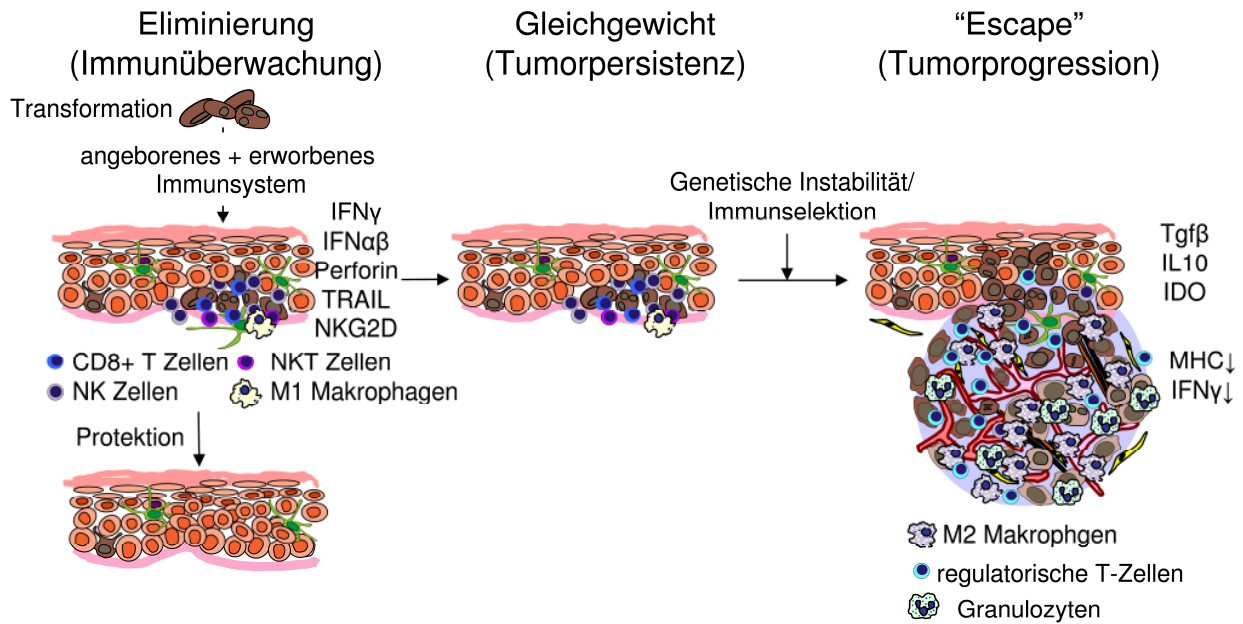


Abb. 3: Konzept der Immunüberwachung maligner Tumore

IFN: Interferon; IL: Interleukin; IDO: Indolamin-2,3-Dioxygenase; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex; NKG2D: aktivierender NK-Zell Rezeptor 2D; NK Zellen: natürliche Killerzellen; NKT Zellen: natürliche Killer-T-Zellen; TRAIL: Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand.

1.6 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Etablierung des Hgf-Cdk4^{R24C} Melanom-Modells im Labor für experimentelle Dermatologie konnte gezeigt werden, dass das mutierte Cdk4^{R24C} Protein die Entstehung DMBA-induzierter, primärer Melanome in Hgf Mäusen dramatisch verstärkt. Die primären Melanome wiesen keine lymphozytären Infiltrate auf. Durch einen adoptiven Transfer mit Melanom-spezifischen T-Zellen, eine adenovirale Vakzinierung und eine adjuvante Immunstimulation ließ sich jedoch eine Elimination von Tumorzellen und eine nachfolgende Immunüberwachung experimentell induzieren. Inwieweit das mutierte Cdk4^{R24C} Protein auch die Entstehung spontaner Melanome beeinflusst und ob eine neonatale UVB-Bestrahlung in pigmentierten Hgf bzw. Hgf- Cdk4^{R24C} C57BL/6 Mäusen wirksam ist, war nicht bekannt. Außerdem war unklar wie sich eine experimentell induzierte, T-Zell-vermittelte Immunüberwachung auf das Wachstum spontaner Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome auswirkt. Diese Arbeit verfolgte deshalb die folgenden drei Hypothesen und Ziele:

1. Hypothese: Das mutierte Cdk4^{R24C} Protein fördert das Wachstum spontaner primärer Melanome ohne Karzinogen in Hgf Mäusen, da es die p16-abhängige Zellzyklus-Kontrolle stört.
Ziel: Analyse der spontanen Tumorentstehung und -progression in Hgf bzw. Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.
2. Hypothese: Eine neonatale UVB-Bestrahlung beschleunigt ähnlich wie DMBA die Melanomentstehung in pigmentierten Hgf-Cdk4^{R24C} C57BL/6 Mäusen.
Ziel: Analyse der Tumorentstehung und -progression nach neonataler UVB Exposition im Vergleich zur DMBA Exposition.
3. Hypothese: Eine experimentell induzierte, T-Zell-vermittelte Immunüberwachung kann auch spontane primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome erkennen, eliminieren und kontrollieren.
Ziel: Analyse des Wachstums spontaner primärer Melanome nach experimenteller Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Mausstämme, Zucht und Haltung

Cdk4^{R24C}-Mäuse wurden ursprünglich in 129SV x CD1 Mäusen mittels „knock-in“ Strategie generiert. Das Hgf-Transgen wurde in FVB-Mäusen eingefügt, hierbei steht Hgf unter der Kontrolle des Metallothionein-Promoters. Sowohl Hgf- als auch Cdk4^{R24C}-Mäuse wurden über mindestens fünf Generationen mit C57BL/6-Mäusen zurückgekreuzt. Für diese Arbeit wurden Zuchtpaare mit Hgf-heterozygoten und Cdk4^{R24C}-homozygoten Männchen mit jeweils zwei Cdk4^{R24C}-homozygoten Weibchen angesetzt. Hgf-transgene Weibchen sind fast immer infertil bzw. unfähig Nachkommen auszutragen, so dass das Hgf-Transgen heterozygot vererbt werden muss. Ca. 28% der Nachkommen sind erfahrungsgemäß Hgf-heterozygot und Cdk4^{R24C}-homozygot (Abbildung 3). Die Überexprimierung von Hgf auf dem BL/6-Hintergrund führt zu einer Vermehrung von Melanozyten in der interfollikulären Epidermis und ist an der schwarzen Hautfarbe im Bereich der Ohren, des Schwanzes und der Pfoten („dark skin phenotype“) leicht erkennbar. Die Cdk4^{R24C} Mutation wurde stichprobenartig durch genomische PCR kontrolliert, die zwischen Wildtyp Mäusen sowie homo- und heterozygoten Trägern der Mutation unterscheidet.

Pmel-1 Zuchtpaare wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) gekauft. Pmel-1 Mäuse exprimieren auf einem Großteil der CD8⁺ Lymphozyten einen transgenen T-Zell-Rezeptor (Tcr α -V1/Tcr β -V13), der die Aminosäuren 22 bis 35 (KVPRNQDWL) von Pmel-17 -dem Maus-Homolog von gp100- MHC I-Db-restringiert erkennt (Overwijk et al., 2003). Pmel-17 ist ein Enzym der Pigment-Synthese, das in Melanozyten und in Melanomzellen exprimiert wird. Zusätzlich sind Pmel-1 Mäuse homozygot für das T- lymphozytenspezifische Thy1.1-Allel (CD90), sodass ihre T-Zellen von den Thy1.2-positiven T-Zellen der BL/6-Mäuse durchflusszytometrisch unterschieden werden können.

C57BL/6 Mäuse (H-2b) wurden entweder bei Charles Rivers Laboratories (Sulzfeld) erworben oder der eigenen Zucht entnommen. Alle Mausexperimente wurden im Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn nach den Richtlinien für Versuchstierhaltung und dem Tierschutzgesetz durchgeführt (Aktenzeichen 9.93 10 BN 36 3/07 und 8.87-50.10.31.09.025).

Maus	Hintergrund	Referenz
CDK4 ^{R24C}	129SvxCD1	Dr. M. Barbacid
HGF/SF	C57BL/6	Dr. G. Merlino
Pmel-1	C57BL/6	Overwijk

Tabelle 1: verwendete Mausstämme

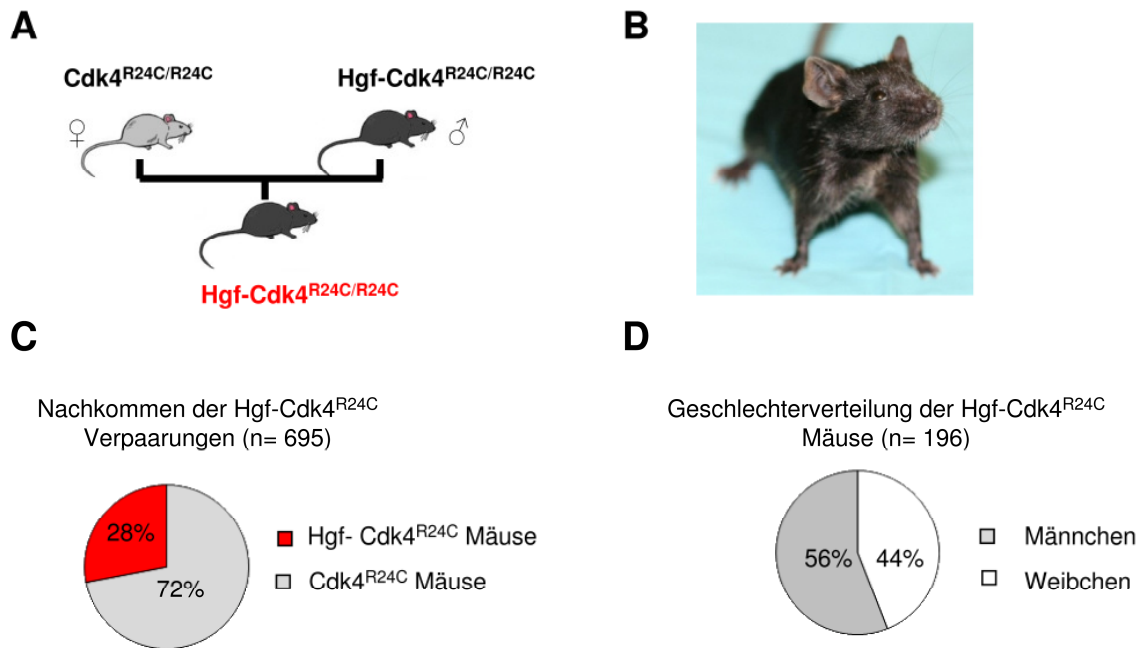


Abb. 4: Zucht von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. **A.** Schematische Abbildung der Hgf-Cdk4^{R24C} Mausezucht. Homozygote Cdk4^{R24C}-Weibchen werden mit Hgf-Cdk4^{R24C} Männchen verpaart. **B.** Repräsentatives Foto einer Hgf-Cdk4^{R24C} Maus. Die transgene Überexpression von Hgf lässt sich makroskopisch an der schwarzen Pigmentierung von Fell, Ohren, Pfoten und Schwanz erkennen. **C.** Anteil von Hgf-Cdk4^{R24C} und Cdk4^{R24C} Mäuse (n = 695) in den Nachkommen. **D.** Geschlechterverteilung der Hgf-Cdk4^{R24C} Nachkommen (n = 196).

2.1.2 Induktion kutaner Melanome durch UVB bzw. DMBA

Neugeborene Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse wurden am 4. Lebenstag einmalig mit 5,6 kJ/m² UVB analog zu den Experimenten von Dr. G. Merlino am NIH (Bethesda, MD) und Dr. F. Noonan an der George Washington University (Washington D.C.) bestrahlt. Alternativ wurde die neonatale UVB-Dosis auf das 3fache erhöht, in dem eine Bestrahlung mit jeweils 5,6 kJ/m² UVB am 4., 5. und 6. Lebenstag erfolgte. Zur Bestrahlung wurde eine Spezialausführung eines UVB-Bestrahlungsgerätes (UV-Typ 4; 0,6 mW/cm²) der Firma Saalman verwendet. Alternativ wurden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse und ihre Cdk4^{R24C}-Geschwistertiere am 4. Lebenstag einmalig mit 25 oder 40 µg 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA), gelöst in Toluol-Aceton, behandelt. Die

Tumorentwicklung wurde engmaschig kontrolliert und durch digitale Fotografie und Bildarchivierung sowie durch Messungen bei jeder Maus verfolgt. Tiere mit progredientem Tumorwachstum (Tumoren größer als 10 mm im Durchmesser) oder mit Krankheitszeichen und Gewichtsverlust wurden getötet, bevor es zu einer wesentlichen Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes kam. Alle Tumoren sowie repräsentative Gewebeproben (Leber, Lunge, Milz, Niere, Gehirn) wurden für spätere Analysen zinkfixiert und in Paraffin eingebettet bzw. schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.3 Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung

Zytotoxische CD8^{+} T-Zellen, die spezifisch das melanozytäre Antigen gp100 erkennen, wurden aus Milzzellen von Pmel-1 Mäusen isoliert und deren prozentualer Anteil durchflusszytometrisch durch Bestimmung der $\text{CD3}^{+}\text{CD8}^{+}\text{V}\beta 13^{+}$ und Thy1.1^{+} Population ermittelt (Overwijk et al., 2003). 2×10^6 dieser Pmel-1 zytotoxischen T-Lymphozyten wurden durch intravenöse Injektion in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse, die ein spontan entstandenes Melanom mit einem Durchmesser von 5 mm trugen, adoptiv transferiert und durch intraperitoneale Injektion von 5×10^8 PFU rekombinanter hgp100 kodierender Adenoviren in 100 μl PBS aktiviert. Einen Tag vor dem adoptiven Transfer erfolgte eine einmalige Chemotherapie durch intraperitoneale Injektion von 2 mg Cyclophosphamid (Endoxan®, Baxter Oncology) in 100 μl PBS (entspricht 100 mg/kgKG). 3, 6 und 9 Tage nach dem adoptiven Transfer wurden jeweils 50 μg der immunstimulatorischen Oligonukleotide CpG 1826 DNA (mit folgender Sequenz: 5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3' von TIB Molbio (Berlin) und Poly I:C (Polyribinosinsäure und Polyribocytidylsäure, Sigma-Aldrich) zusammen in 100 μl PBS gelöst und peri-/intratumoral injiziert (Kohlmeyer et al., 2009). Der Einfluss dieser therapeutischen Intervention wurde durch wöchentliche Inspektion der Tumorgöße und digitale Fotografie dokumentiert. Bei einem Tumordurchmesser von mehr als 10 mm oder bei Krankheitszeichen wurden die Mäuse geopfert.

2.2 *Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz*

2.2.1 Fixierung, Einbettung und Herstellung von Gewebeschnitten

Frisch präparierte Proben von Haut, Lymphknoten, Milzen und Tumoren wurden 24h in Zink fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2155) wurden Schnitte von 4 μm Dicke angefertigt, die auf einem beschichteten Objektträger über Nacht bei 37°C getrocknet wurden. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zur Entparaffinisierung zunächst in Xylol inkubiert (2x 2 min Xylol) und nachfolgend in einer Ethanolreihe abnehmender Konzentration (2 x 45 s 100% Alkohol, 30 s

96% Alkohol, 30s 70% Alkohol) rehydriert und in H₂O überführt. Die stark pigmentierten Tumore wurden vor Färbungen mit 3% H₂O₂ 30-60 Minuten (je nach Pigmentgehalt) bei 37 ° C geblichen.

2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Morphologie wurden von allen Präparaten Gewebeschnitte mit H.E. gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Er färbt als Hämaun alle sauren (basophilen) Strukturen, insbesondere Zellkerne (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (RNA) an. Eosin, ein synthetischer saurer Farbstoff, färbt alle azidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen, vor allem die Zytoplasmaproteine, rot an.

Die entparaffinisierten Gewebeschnitte wurden für 2 Minuten mit Mayers Hämaunlösung bedeckt und anschließend für 5 Minuten mit Leitungswasser gespült (sog. Bläuen, durch die Erhöhung des pH-Wertes durch das Spülen mit Leitungswasser kommt es zum typischen Farbumschlag ins Blauviolette). Anschließend erfolgte die Zytoplasmafärbung mit 1%iger Eosinlösung für 5 Minuten. Weitere Spülschritte geschahen über eine aufsteigende Alkohldreihe (70%, 96%, 2 x 100%, Xylol). Der entwässerte Schnitt wurde abschließend mit Corbitt-Balsam eingedeckelt.

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz

<i>Primärantikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Referenz</i>	<i>Antigen retrieval</i>
CD45	mA, Ratte	1:50	BD Bioscience #550539	-
CD3	mA, Ratte	1:500	Serotec, #MCA 1477	10 min, Citratpuffer pH6
Gr-1	mA, Ratte	1:50	BD Bioscience #550291	-
Meca32	mA, Ratte	1:50	BD Bioscience # 553849	15 min pH6
Trp1 (Pep7)	pA, Kaninchen	1:200	Vincent Hearing, NIH, Bethesda	-

Tabelle 2: Verwendete Antikörper in der Immunhistologie/Immunfluoreszenz

Die optimalen Konzentrationen und Inkubationszeiten der jeweiligen Antikörper wurden ausgetitriert. Alle Gewebeschnitte wurden vor der Färbung geblichen. Als Positivkontrolle für anti-CD45, anti-CD3, anti-Gr1 und anti-Meca32 dienten Milz- und Lymphknotengewebeschnitte. Als Negativkontrolle diente jeweils ein zusätzlicher Gewebeschnitt, bei dem der Primärantikörper durch eine PBS-BSA-Lösung ersetzt und das Präparat nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert

wurde. Als Sekundärantikörper dienten ein Ratte-Biotin- sowie ein Kaninchen-Biotin-konjugierter Antikörper aus der Ziege von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) jeweils in einer Verdünnung von 1:500.

Antigendemaskierung

Zum Nachweis von CD3 erfolgte nach Entparaffinierung, Rehydrierung und Bleichung des Gewebeschnittes eine Antigendemaskierung durch 10 minütige Inkubation in Citratpuffer pH 6 bei ca. 95-99 °C im Dampfgerät. Der Wirkmechanismus dieser Antigendemaskierung ist noch weitgehend ungeklärt. Man geht davon aus, dass durch diese spezielle Vorbehandlung mit Hitze intermolekulare Vernetzungen des Formalins bzw. Zinks mit Proteinen, die zu einer Antigenmaskierung führen, gelöst werden können (Shi et al., 1991).

Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode = Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode)

Prinzip: *Unkonjugierter Primärantikörper* + *biotinmarkierter (=biotinylierter) Sekundärantikörper* + *Avidin-Biotin-Enzymkonjugat* + *Substrat/Chromogen* => *Farbe*

Die LSAB-Methode ist ein Drei-Schritt-Verfahren. Dabei bindet der Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen (1. Schritt). Der biotinylierte Sekundärantikörper fungiert als Brückenantikörper (2.Schritt). An diesen Brückenantikörper wiederum bindet ein Komplex aus Streptavidin (*Streptomyces avidinii*), das eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin besitzt, und der alkalischen Phosphatase (3. Schritt). Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das mit organischen Phosphateestern reagiert, sie hydrolysiert und dadurch Phosphatgruppen transferiert. Als Substrat der alkalischen Phosphatase wird Naphtholphosphatester zu Phenolphosphatkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Die Phenole reagieren anschließend mit farblosen Diazoniumsalzen, den Chromogenen, zu unlöslichen Azofarbstoffen. In unserer Untersuchung wurde das Chromogen Fuchsin verwendet, welches ein rotes Reaktionsprodukt an der Stelle des gesuchten Antigens liefert, das teilweise in organischen Lösungsmitteln löslich ist. Daher wurden abschließend nicht-alkoholische Gegenfärbemethoden und wasserlösliche Eindeckmittel (Glycerin) verwendet.

Das verwendete Protokoll:

- Blockung der unspezifischen Bindungen mit 5% BSA (Bovine serum albumine) in PBS für 30 min
- 2x 5 min Waschen mit TRIS-Puffer

- Inkubation des Primärantikörpers (100 µl) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C im Kühlschrank über Nacht
- 2 x 5 min Waschen mit TRIS-Puffer
- Inkubation des Sekundärantikörpers (100 µl) für 30 Minuten
- 2 x 5 min Waschen mit TRIS – Puffer
- Alkalische Phosphatase Lösung aus dem LSAB-AP-Kit von Dako Cytomation für 20 Minuten
- 2 x 5 min Waschen in TRIS-Puffer
- Fast Red (Dako Cytomation) für 15 Minuten
- 2 x 5 min Waschen in TRIS-Puffer
- Gegenfärbung mit Haematoxylin für 20 Sekunden
- Eindeckung mit Glycerin (Kaisers Glyceringelantine)

Fluoreszenzmarkierung

Nach Entparaffinisierung, Rehydrierung und Bleichung wurden die unspezifischen Bindungen durch 5% ige PBS-BSA-Lösung für 20 Minuten blockiert. Nach einem kurzen Waschschrift in TRIS-Puffer erfolgt die Inkubation des Primärantikörpers über 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Durch zweimaliges Waschen mit TRIS-Puffer über einen Zeitraum von 5 min wurden ungebundene Reste des ersten Antikörpers entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper über einen Zeitraum von 60 min bei RT unter Lichtausschluß. Nach zwei weiteren Waschungen mit TRIS-Puffer erfolgte die Kernfärbung mit 300 µl DAPI pro Objektträger für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Abdunkelung. Nach sorgfältigem Waschen des Schnitts wurde das Präparat mit Immunfluoreszenzmedium (biomeda) eingedeckelt.

Die Beurteilung der Präparate erfolgte an einem Leica DMLB Mikroskop, die mikroskopischen Bilder wurden mittels Digitalkamera (JVC KY-F75U) aufgenommen.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Durch die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) können Zellen nach Größe, Granularität und Oberflächenantigenen dargestellt und quantifiziert werden. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit an Fluorochromen gebundenen

Antikörpern gegen das zu messende Oberflächenantigen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt.

Am Messpunkt führen Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre Granula zu einer Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls, die durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht) registriert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer BD FACSCanto II ist mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren und somit die benutzten Fluorochrome zur Fluoreszenz anregen. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm und ein Diodenlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 635 nm.

Die Intensität des Vorwärtsstreulichts wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des Seitwärtsstreulichts durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Der Laserstrahl regt weiterhin das Fluorochrom der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die ebenfalls in Linsen gesammelt werden. Dabei trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es, nach den Wellenlängenbereichen aufgetrennt, zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Oberflächenantigen.

2.3.2 Isolation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten

In frisch entnommene Milzen wurde in einer Petrischale mittels 1 ml Spritzen und 27G Kanülen 1-2 ml Kollagenaseverdaulösung injiziert, anschließend wurden diese mit einer Schere zerkleinert und in 7 ml Kollagenaseverdaulösung eingebracht. Lymphknoten wurden von Fettgewebe gesäubert, mittels Schere zerkleinert und in 3 ml Kollagenaseverdaulösung eingelegt. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige (Milzen) bzw 45-minütige Inkubation bei 37° C. Die Inkubation wurde mit 2 ml 0,1 M EDTA- Lösung und weiteren 10 Minuten bei 37° C abgestoppt. Die so entstandenen Suspensionen wurden mit dem Kolben einer 1 ml Spritze durch ein steriles Nylosieb (Maschengröße 100µm) gerieben und nach Zugabe von 10 ml sterilem PBS bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das verbleibende Pellet in 3 ml Ery-Lyse-Puffer resuspendiert und bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 ml PBS hinzugefügt, die Suspension wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension des Pellets in PBS wurde die Zellsuspension nochmals durch ein steriles Nygonsieb (Maschengröße 100µm) gefiltert und die Anzahl lebender Zellen in der Neubauer-Zählkammer durch Exklusion mit Trypan-Blau bestimmt.

2.3.3 Isolation und Aufreinigung von Tumorzellen

Nach Entnahme wurden die Tumoren von Fett- und Bindegewebe freipräpariert und es erfolgte ein Kollagenaseverdau analog der Milzaufreinigung. Anschließend wurde die Suspension durch ein steriles Nygonsieb (Maschengröße 100µm) gefiltert, verbleibende Tumorstücke mit dem Kolben einer 1 ml Spritze zerrieben und mit 10 ml PBS gespült. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgeschüttet, das verbleibende Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und die vitalen von avitalen Zellen mittels Trypan-Blau-Färbung unterschieden und in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

2.3.4 Durchflusszytometrische Färbungen und Analyse

Für die extrazelluläre Färbung wurden 10^6 frisch isolierte Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 100 µl CD16/32 („Fc-Block“) enthaltenden FACS-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Danach wurden die Zellen abermals mit FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von 20 µl der jeweiligen Antikörperlösung für 20 Minuten bei 7 °C inkubiert. Dieser und auch alle folgenden Inkubationschritte erfolgten bei Abdunkelung der Röhrchen. Es folgte ein Wasch- und Zentrifugationsschritt. Zum Abschluss wurden die Zellen in 1000µl FACS-Puffer resuspendiert und im FACS Canto eingemessen.

2.4 *Molekularbiologische Methoden*

2.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Frisch präpariertes Tumorgewebe wurde in flüssigem Stickstoff direkt nach Entnahme schockgefroren und bei –80° C gelagert. Die Proben wurden mittels Mörser und Pistille, die zur RNase-Inaktivierung bei 200° C Heißluft sterilisiert wurden, in flüssigem Stickstoff zermahlen.

Die RNA-Isolation aus Tumorgewebe erfolgte mit dem Nuleospin RNAII Kit von Machery Nagel (Düren, Deutschland), das jedoch keine ausreichende RNA-Konzentration aus Haut- und Nävusgewebe erzielte. Daher wurde zur Isolation von RNA aus Haut- und Nävusgewebe eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit einem chaotropen Denaturierungsmittel (Guanidiniumthiocyanat), dem sog. TRIzol von Invitrogen verwendet. Guanidiniumthiocyanat wirkt stark denaturierend und unterstützt die Inaktivierung von RNasen. Zusätzlich erfolgte eine RNA-Aufreinigung mit dem Nuleospin RNAII Kit von Machery Nagel. Während dieses Prozesses wird u.a. DNA-Kontamination durch DNase-Verdau reduziert. Die RNA-Messung und die Bestimmung ihrer Reinheit wurden photometrisch mit dem Nanodrop ND1000 von PegaLab (Erlangen, Deutschland) bei den Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm durchgeführt. Aus der Extinktion der Lösung kann die Konzentration anhand des folgenden Verhältnisses berechnet werden: (Optische Dichte) $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/mL doppelsträngiger (ds) DNA, 40 µg/mL RNA, 33 µg/mL einzelsträngiger DNA und etwa 20 µg/mL bei Oligonucleotiden. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280} zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Alkohol und Reste von Proteinen verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nucleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol (Absorptionsmaximum bei 270 nm) kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Der Quotient der OD_{230} zur OD_{260} ist ein weiterer Indikator für Verunreinigungen z.B. mit Polysacchariden. Er sollte im Idealfall bei 0,45 liegen. Die RNA wurde mit einem Qiagen RNeasy Mini Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.4.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Anschließend erfolgte die reverse Transkription um instabile mRNA in stabile cDNA umzuschreiben mittels des Superscript III Kits und Oligo-dT18 Primern (beides von Invitrogen) in einem Eppendorf Mastercycler. Die Oligo-dT18 Primer binden an den terminalen PolyA-Schwanz der mRNA, von wo aus die cDNA-Synthese durch die reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) erfolgt.

2.4.3 Real-Time quantitative PCR

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, einen spezifischen DNA-Abschnitt *in vitro* zu amplifizieren. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-

Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des spezifischen DNA-Abschnittes homolog ist. Die Reaktion durchläuft drei Schritte:

1. Hitzedenaturierung zur Auftrennung des Doppelstranges (30 sec bis 4 min bei 95°C)
2. spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung, Annealing) durch Temperatursenkung je nach Primersequenz auf 45-75°C
3. DNA-Synthese (Elongation) der angelagerten Primer durch DNA-Neusynthese bei 72°C bei einer *Taq* (*Thermus aquaticus*)-DNA-Polymerase.

In der Regel werden ca. 25-35 Zyklen durchlaufen.

Bei der Real-Time quantitativen PCR nutzt man Fluoreszenzsignale zur Quantifizierung der durch die PCR vervielfältigten DNA. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von Nukleinsäure-interkalierenden Farbstoffen wie SYBR-Green I. Dieser bindet doppelsträngige DNA. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht bei etwa 521 nm. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Der Vorteil von SYBR-Green I ist die universelle Verwendbarkeit, da es unspezifisch ist und damit für jede beliebige PCR-Reaktion eingesetzt werden kann, sowie die hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet. Es fehlt jedoch eine spezifische Bindung des Fluorophors an die zu amplifizierende Ziel-DNA, sodass eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren nicht möglich ist. Allerdings kann durch eine Schmelzkurvenanalyse eine Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten erfolgen. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte. Beim TaqMan- oder auch 5'-Nuclease-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid, die so genannte TaqMan-Probe. TaqMan-Proben sind Sonden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem intern eingebauten oder am 3'-Ende liegenden Quencher markiert sind. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten TaqMan-Sonde durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5', 3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist wiederum proportional der

Menge des DNA-Templates. Häufig wird Fluorescein (FAM) als Reporter und Rhodamin (TAMRA) als Quencher verwendet.

	<i>Primersequenz von 5`nach 3`</i>
<i>Ifnγ</i>	<i>forward CTCTTCTTGGATATCTGGAGG</i> <i>reverse CCTGATTGTCTTTCAAGACTTC</i>
<i>Granzym B</i>	<i>forward CTCCAATGACATCATGCTGC</i> <i>reverse TGGCTTCACATTGACATTGC</i>
<i>Perforin 1</i>	<i>forward TGAGAAGACCTATCAGGACC</i> <i>reverse AAGTCAAGGTGGAGTGGAGG</i>

Tabelle 3: Verwendete Primer Sybr Green RT-PCR:

	<i>ID</i>
<i>CXCL-10</i>	<i>Mm00445235_m1</i>
<i>CXCL2</i>	<i>Mm00436450_m1</i>
<i>IL-6</i>	<i>Mm00446190_m1</i>
<i>TRP2</i>	<i>Mm00494456_m1</i>
<i>Spp1</i>	<i>Mm00436767_m1</i>
<i>gp100</i>	<i>Mm00498996_m1</i>

Tabelle 4: Verwende Taqman Sonden für qRT-PCR

2.4.4 DNA Isolation, Amplifikation und Sanger Sequenzierung

Genomische DNA von kryokonservierten Tumorgewebeproben und zur Kontrolle von Milzproben wurde mit Hilfe des Nucleo Spin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) nach Angaben des Herstellers isoliert. Eine PCR mit spezifischen Primern für jedes Exon der unten aufgeführten Gene wurde mit der High-fidelity DNA Polymerase (Phusion Hot Start II, Finnzymes, Espoo, Finnland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe des NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, Germany) sequenziert.

Gene	Sense	Antisense
Braf exon 18	5'TTTTACCTGAAATCTTCAAAATGC	5'AAGCCCTTCAGTGTATTTCTCG
N-ras exon 3	5'TACTGTTAGCGGGTTGAGGG	5' TGTTCCTGGCCTCCACAAAAC
p53 exon 5+6	5' ACACCTGATCGTTACTCGGC	5' GGGTTGCTAGAAAGTCAACATC
p53 exon 7+8	5' TATAGCCAGCCATTCCCG	5' GTGACTTTGGGGTGAAGCTC

Tabelle 5: Verwendete Primer zur Mutationsanalyse der braf, nras und p53 Gene

2.5 Statistische Analysen

Statistische Signifikanzanalysen wurden unter Zuhilfenahme des SPSS 11 Computerprogramms mit dem Student-t-Test berechnet. Alle Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben (mit n bezeichnet). Bei allen PCR-Werten erfolgte die Darstellung der ermittelten Werte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“; SEM). Signifianztestungen wurden bei zwei zu vergleichenden Gruppen mittels t-Test durchgeführt. Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von 5% abgelehnt ($p < 0,05$). In den Abbildungen bedeuten: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

2.6 Verwendete Substanzen

2.6.1 Lösungen und Puffer

Ery-Lyse-Puffer (pH 7,3)	155 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) 10mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) 0,1 mM Na-EDTA
FACS-Puffer	0,2% Na-EDTA 1% FCS in PBS gelöst
Kollagenase-Verdau-Lösung	1 mg Kollagenase D pro ml PBS 5% FCS 0,02mg DNase 1 pro ml PBS in PBS gelöst
TRIS-Puffer	16,6g TRIS-Pulver (DAKO) 0,5 ml Tween 20 (Roth) in 1l Aqua dest.

2.6.2 Chemikalien und Reagentien

2-Mercaptoethanol	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
-------------------	---------------------------------------

2-Propanolol

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, München, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Roche, Prenzberg, Deutschland
DNAse I	Sigma, München, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	PAA
Formalinfreie Zinkfixierung	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Glycerin	
Haemotoxinilin	
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenkarbonat(KHCO ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase D	Roche, Prenzberg, Deutschland
L-Glutamin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Narium-EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol) C ₄ H ₁₁ NO ₃	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma, München, Deutschland
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)30%	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.6.3 Antikörper Durchflusszytometrie

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Firma	Verdünnung
Maus CD3	FITC	Hamster IgG1,κ	145-2C11	BD	1:2
Maus CD8a	APC-Cy7	Ratte IgG2a,λ	53-6.7	BD	1:100
Maus CD8a	PerCp	Ratte IgG2a, κ	53-6.7	BD	1:250
Maus CD11b	FITC	Ratte IgG2b, κ	M1/70	Bio Legend	1:250

Maus CD11c	Alexa 647	Ratte IgG2b, κ	30-F11	BD	1:100
Maus CD16/32 („Fc-Block“)	Unkonjugiert	Ratte IgG2a, λ	93	Bio Legend	1: 300
Maus CD19	Alexa 647	Ratte, IgG2a, κ	1D3	BD	1:200
Maus CD 45	FITC	Ratte IgG2b, κ	30-F11	BD	1:500
Maus MHC I	PE	Maus IgG2a, κ	AF6-88.5		1:100
Maus MHC II	FITC	Maus IgG2a, κ	AF6-120.1	BD	1:250
Maus Gr-1	PE	Ratte IgG2b, κ	RB6-8C5	BD	1:100

Tabelle 6: Verwendete Antikörper bei der Durchflusszytometrie

2.6.4 Kits und gebrauchsfertige Reagentien

LSAB-AP Kit

DAKO, Hamburg Deutschland

Oligo-dT-18 Primer

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Power Sybr Green Master Mix

Applied Biosystems, Darmstadt,

RNase-free DNase Set

Quiagen, Düsseldorf, Deutschland

RNeasy Mini Kit

Quiagen

Taqman Universal PCR Master Mix

Applied Biosystems, Darmstadt

Trizol Reagents

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Nucleo Spin Tissue Kit

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

NucleoSpin Extract II kit

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Entstehung melanozytärer Tumoren in Hgf und Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen

3.1.1 Spontane Entstehung von Nävi und Melanomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen

Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund, bei denen durch eine transgene Überexpression des Hepatozytenwachstumsfaktors (Hgf) eine aberrante Rezeptor-Tyrosinkinase-abhängige Signaltransduktion induziert wird, zeigen einen „dark skin phenotype“, da die Verteilung der Melanozyten - ähnlich wie beim Menschen - die dermo-epidermale Junctionszone miteinbezieht (Noonan et al., 2001). Diese Mäuse entwickelten nach dem 8. Lebensmonat multiple pigmentierte melanozytäre Läsionen < 2mm. Wenn diese keine Wachstumstendenz zeigten, werden sie als „Nävus“ definiert. Im weiteren Verlauf entstanden bei 4 von 14 Tieren (29%), v.a. im 2. Lebensjahr, progressiv wachsende Melanome. Hgf-transgene Mäuse, die zusätzlich eine Keimbahnmutation in der Zyklin-abhängigen Kinase 4 tragen (Hgf-Cdk4^{R24C}) und damit eine gestörte p16-abhängige aufweisen, entwickelten bereits ab dem 6. Lebensmonat multiple Nävi. In einer Kohorte von 63 Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen wurde bei allen Tieren ein progressiv wachsendes Melanom beobachtet. Die kumulative Inzidenz von Melanomen in Hgf und Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen ist in Abbildung 5C dargestellt. Die Cdk4^{R24C} Mutation erhöht nicht nur die Penetranz, sondern verringert auch die Latenz der Melanomentstehung in Hgf-transgenen Mäusen. Das Lebensalter in Tagen beim Auftreten spontaner primärer Melanome war in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen signifikant geringer ($p=0,002 < 0,05$) als in Hgf-transgenen Mäusen. Cdk4^{R24C} Mäuse ohne Hgf Transgen entwickeln keine Melanome.

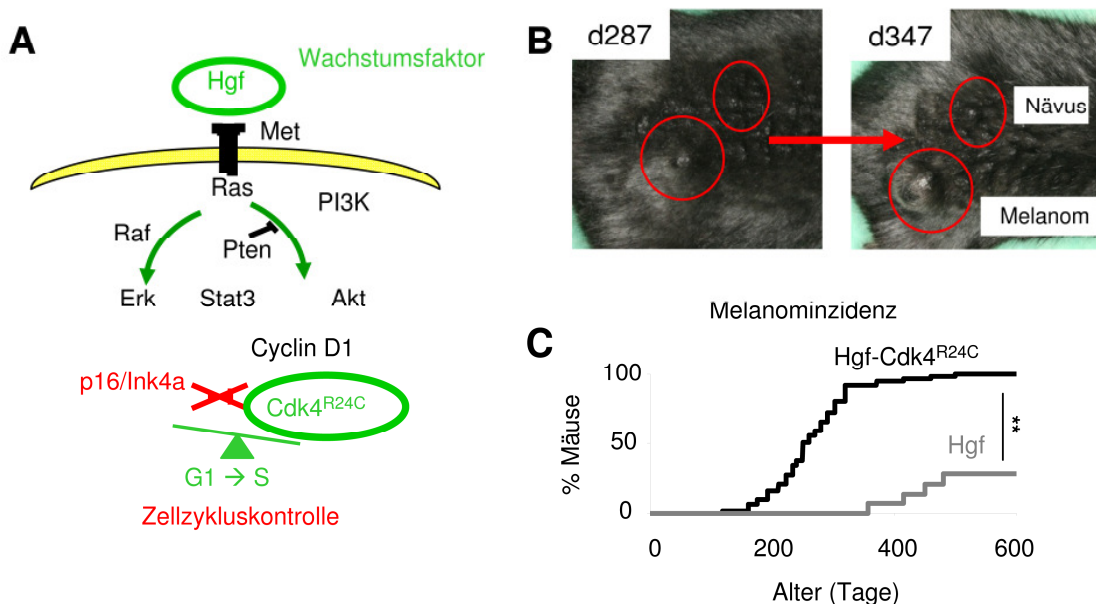


Abb. 5: Die transgene Überexpression des Hepatocyte growth factors (Hgf) und eine CDK4^{R24C} Mutation in der Keimbahn kooperieren bei der Entstehung von spontanen primär kutanen Melanomen in Mäusen

A. Schematische Darstellung der molekularen Pathogenese, die in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zur Entstehung von spontanen Melanomen führt. Cdk4: Zyklin-abhängige Kinase 4; p16/Ink4a: Zyklin-abhängiger-Kinase Inhibitor 2A; ERK: Extrazellulär Signalregulierte Proteinkinase; Hgf: Hepatozytenwachstumsfaktor; Met: Met Protoonkogen; Raf: Serin/Threonin-Proteinkinase; Ras: Proto-Onkogen (Rat sarcoma); PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; Pten: Phosphatase und Tensinhomolog. **B.** Repräsentative makroskopische Aufnahme eines Rückens einer Hgf-Cdk4^{R24C} Maus zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. **C.** Prozentsatz an Hgf-Cdk4^{R24C} (n=63) und Hgf (n=14) Mäusen, die über die Zeit progressiv wachsende Melanome (> 2 mm) entwickeln (** = p < 0,01).

Spontane Melanome sind in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen inhomogen verteilt und variieren in der Anzahl und der Wachstumskinetik. In 80% sind die Melanome auf dem Rücken lokalisiert. Seltener finden sich Melanome im vorderen Rumpfbereich, im Genitalbereich, am Schwanz, den Extremitäten oder an Ohr und Nase (Abb. 6). 47 der 63 Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse (75%) zeigten ein noduläres Melanom. Die übrigen 16 (25%) wiesen ein oberflächlich langsam wachsendes Melanom auf. Von den 47 Mäusen mit nodulärem Melanom konnte in 27 (58%) eine rasche Wachstumskinetik mit einer Tumorverdopplungszeit innerhalb von weniger als 21 Tagen und in 20 (43%) eine deutlich langsamere Wachstumskinetik beobachtet werden. Noduläre Melanome neigten zur Ulzeration.

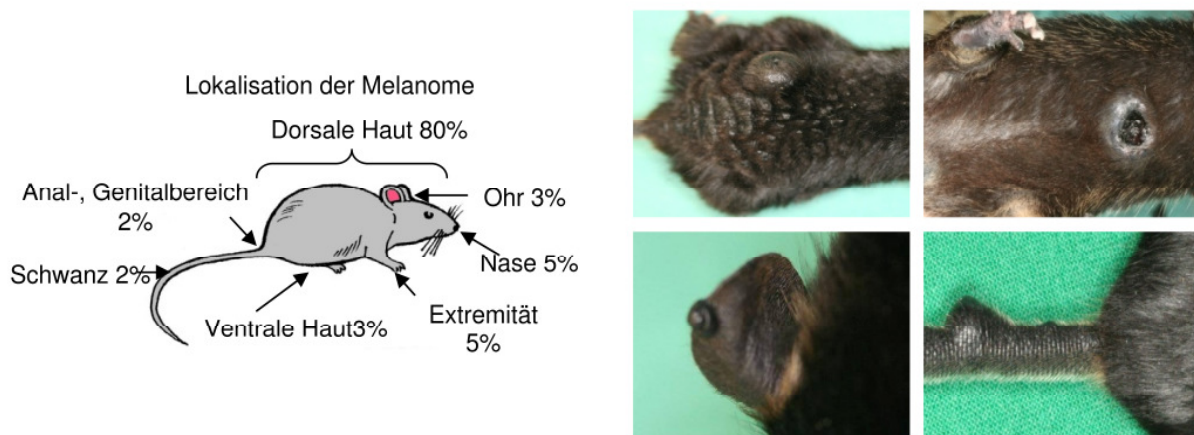


Abb. 6: Verteilung von spontanen Melanomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Links: Schematische Darstellung der Verteilung der spontanen Melanome in % (n=63). Rechts: Repräsentative Makroskopie von Melanomen am Rücken (links oben), Bauch (rechts oben), Ohr (links unten) und Schwanz (rechts unten).

Das Überleben der Mäuse ist abhängig von der Wachstumskinetik ihrer Melanome. Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse mit rasch wachsendem nodulärem Melanom leben im Durchschnitt 328 ± 85 Tage und damit signifikant kürzer als Mäuse mit langsam wachsendem Melanom, die 384 ± 66

Tage leben ($p=0,023$). Oberflächliche Melanome entstehen meist erst im späteren Lebensalter und wachsen langsam. Diese Mäuse leben mit 402 ± 100 Tagen am längsten (Abb. 7).

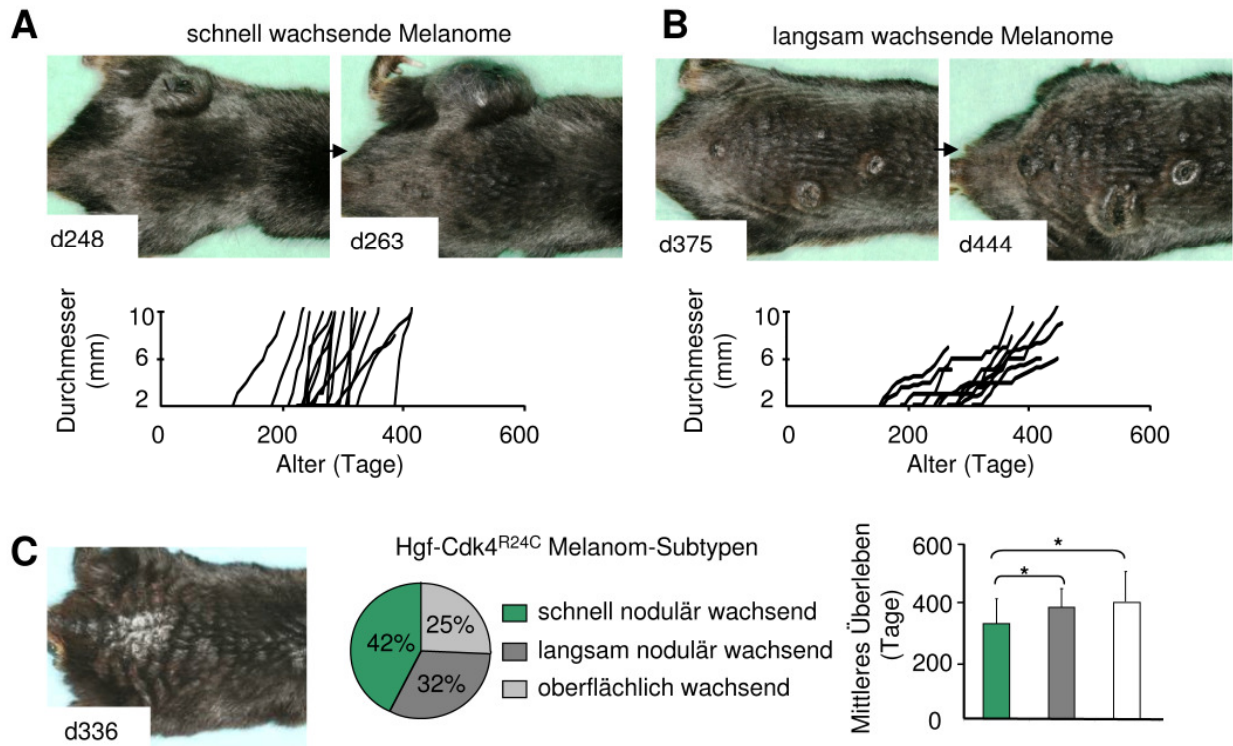


Abb. 7: Makroskopische Einteilung von spontanen Melanomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen A. Oben: Repräsentative Fotos des Rückens einer Hgf-Cdk4^{R24C} Maus zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mit schnell wachsendem Melanom und Tumorstadiumskinetiken von 27 Mäusen mit rasch wachsenden nodulären Melanomen. Dargestellt ist der größte Melanomdurchmesser über die Zeit. B. Repräsentative Makroskopie und Wachstumskinetiken von Mäusen mit langsam wachsenden nodulären Melanomen ($n=20$). C. Links: Repräsentatives Foto einer Hgf-Cdk4^{R24C} Maus mit einem oberflächlich wachsendem Melanom. Mitte und rechts: Einteilung der Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome mit entsprechenden Kaplan-Meier-Überlebenskurven (* = $p < 0,05$).

Das Auftreten von multiplen gutartigen melanozytären Läsionen $<2\text{mm}$ in fast allen Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen, gefolgt von der Entwicklung von einzelnen progressiv wachsenden Melanomen spricht für die schrittweise maligne Transformation der Melanozyten in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Nur in 5 von 63 Fällen entstanden progressiv wachsende Melanome in jungen Mäusen (<240 Tage), die noch keine Nävi zeigten. Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Nävus- und Melanomenstehung von sieben verschiedenen Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Obwohl in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen beide genetischen Veränderungen in allen Zellen zu finden sind, wird selektiv die maligne Transformation in Melanozyten begünstigt. Andere Tumore wie z.B. Lymphome wurden nur in wenigen Mäusen beobachtet. Zeichen einer spontanen Regression konnten bei Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen nicht beobachtet werden.

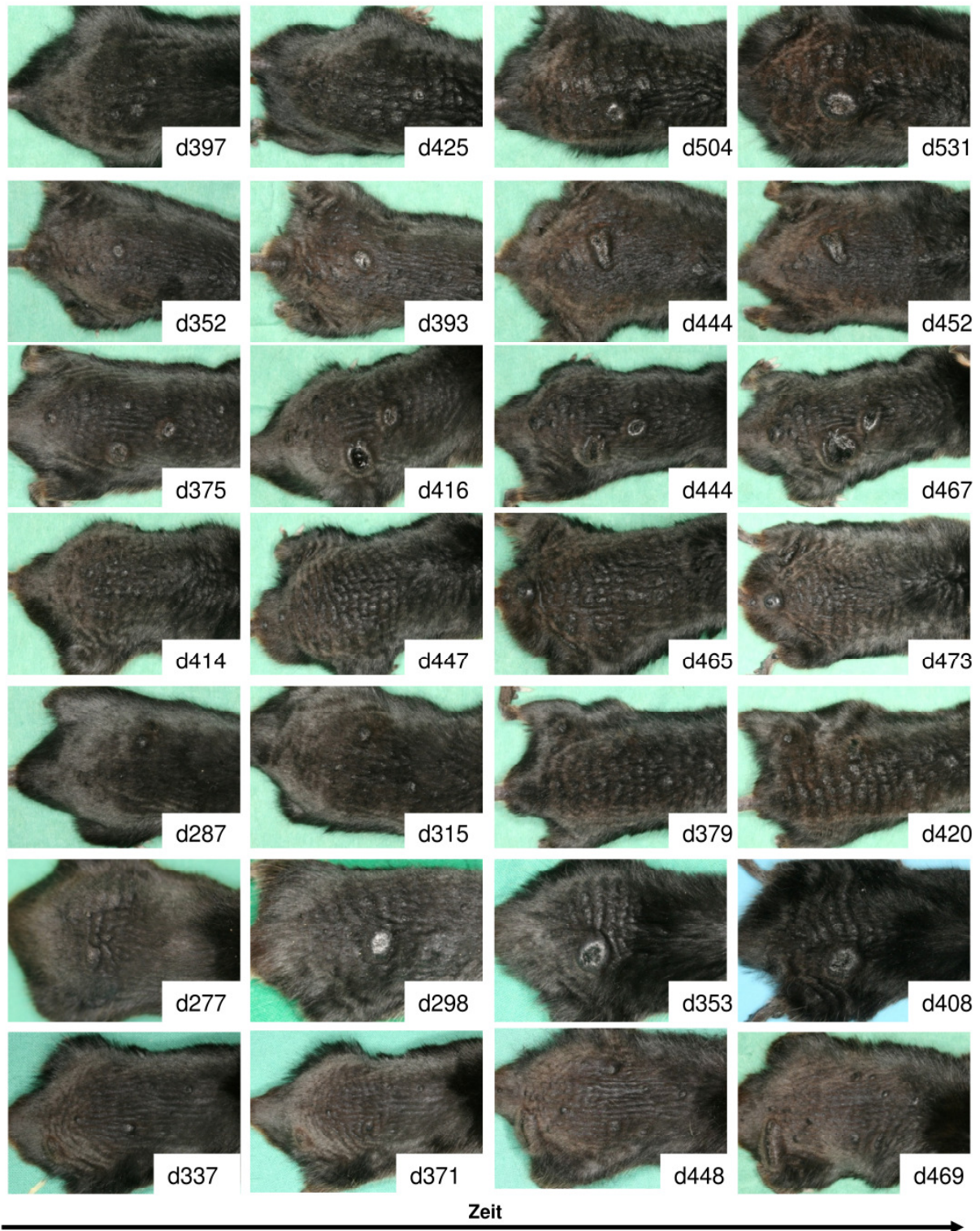


Abb. 8: Spontane Nävus- und Melanomentstehung in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen: Repräsentative makroskopische Bilder der Rücken von 7 verschiedenen Mäusen zu jeweils 4 verschiedenen Zeitpunkten (Lebensalter in Tagen).

Histomorphologisch bestehen „Nävi“ in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen vorwiegend aus stark pigmentierten, epitheloiden Zellen. Nävi zeigen keine Ulzeration oder ausgeprägte Vaskularisation. Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome sind histomorphologisch asymmetrische, noduläre Läsionen mit stark pigmentierten, epitheloiden, häufig zu Nestern angeordneten und weniger pigmentierten, spindeligen Tumorzellen. Die Zellkerne sind hyperchromatisch und polymorph. Vereinzelt findet man Mitosefiguren. Die dermo-epidermale Junctionszone ist mit einbezogen und von Tumorzellen durchsetzt. Das invasive Wachstum führt häufig zu einer oberflächlichen Ulzeration der Epidermis und zu einer Zerstörung der Haarfollikel. Oberflächlich flach wachsende Melanome wachsen zwar weniger invasiv, zeigen jedoch ebenfalls typische Malignitätszeichen wie Ulzeration und Destruktion der Adnexstrukturen (Abb. 9).

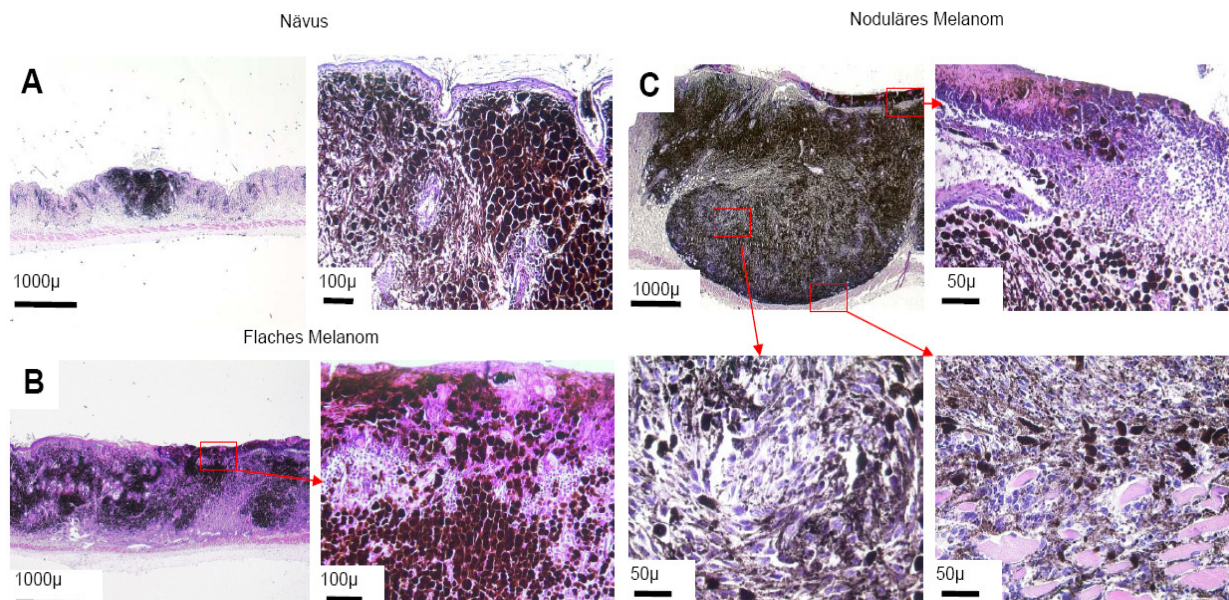


Abb. 9: Histomorphologische Analyse von „Nävi“ und Melanomen (H&E gefärbt). A. Links Überblick einer melanozytären Läsion, die bis zu einem Durchmesser von 2 mm keine weitere Wachstumstendenz zeigt (2,5x Vergrößerung). Rechts: Detailaufnahme eines Nävus mit vorwiegend stark pigmentierten epitheloiden Zellen (200x Vergrößerung). B. Links: Überblick eines oberflächlich wachsenden Melanoms (2,5x Vergrößerung). Rechts: Detailaufnahme der ulzerierten Epidermis (200x Vergrößerung). C. Typisches noduläres Wachstum eines Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms im Überblick (2,5fache Vergrößerung). Rechts oben: Ulzerationszone mit Granulozyteninfiltration. Links unten: Zentraler Tumorbereich mit stark pigmentierten epitheloiden und weniger pigmentierten, spindeligen Zellen. Rechts unten: Tumorrandbereich mit Infiltration in die Muskulatur (400x Vergrößerung).

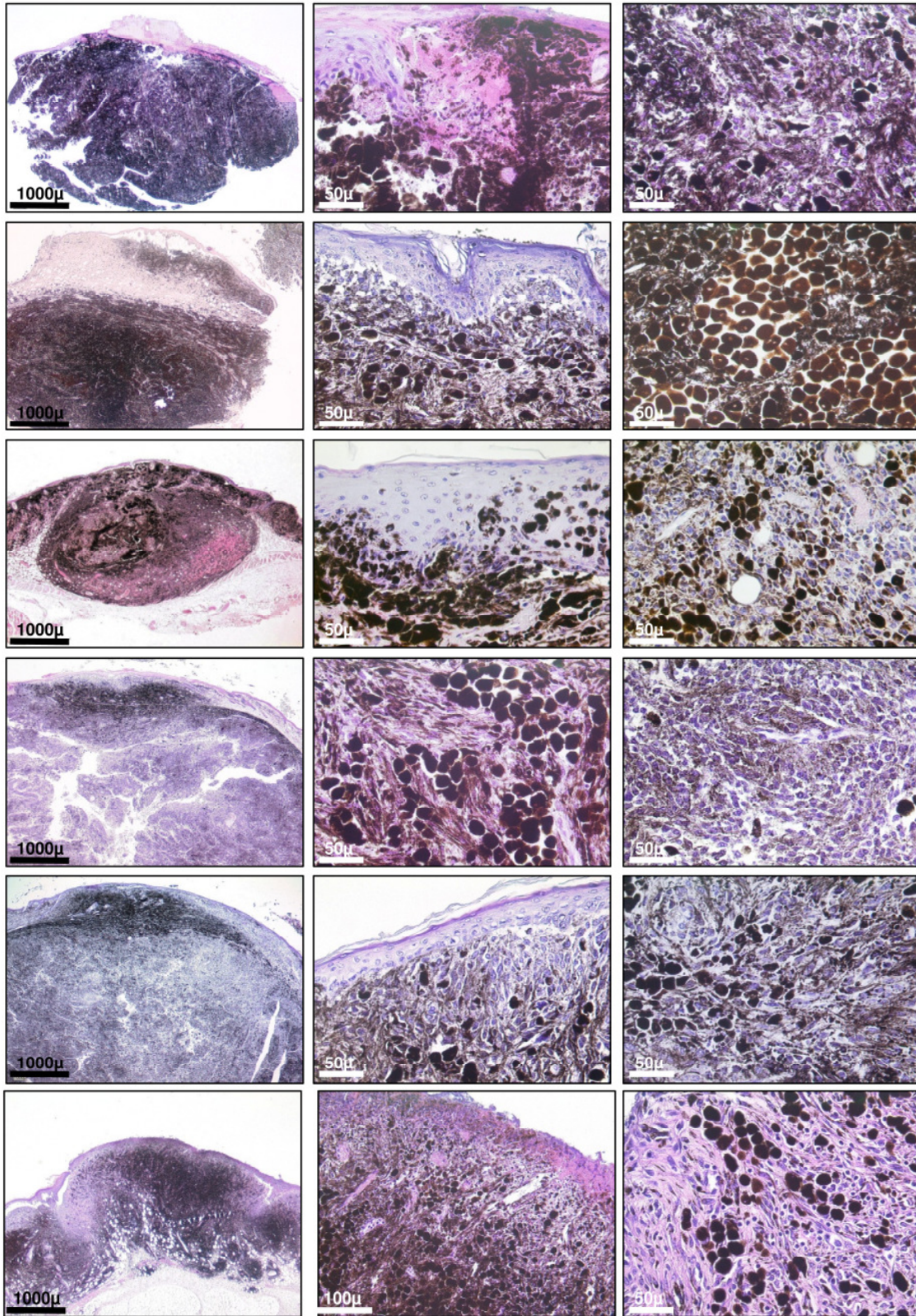


Abb. 10: Histomorphologische Variabilität der Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome. Von oben nach unten 6 verschiedene H&E gefärbte Melanome im Überblick mit jeweils zwei Detailaufnahmen.

Drei von 63 Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen zeigen histomorphologisch einen Pigmentverlust und unterscheiden sich deutlich von den übrigen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. Sie bestehen überwiegend aus unpigmentierten, spindeligen, z.T. fischzugartig angeordneten Tumorzellen, zwischen denen sich vermehrt Lymphozyten finden (Abb. 11). Der melanozytäre Ursprung dieser Zellen wurde mit einer immunhistochemischen Färbung für Trp2 bestätigt (Daten nicht dargestellt).

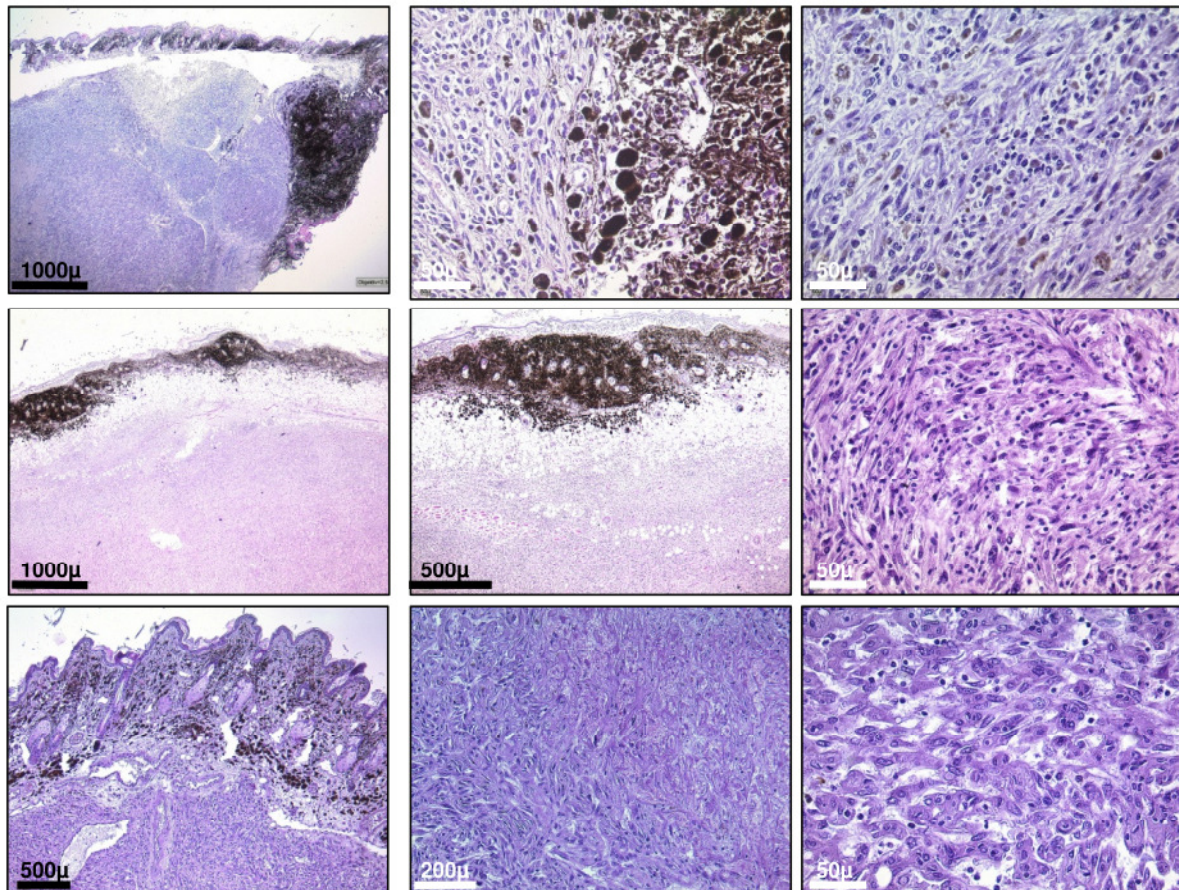


Abb. 11: Histomorphologischer Pigmentverlust in 3 von 63 Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. Von oben nach unten 3 verschiedene H&E gefärbte Melanome im Überblick mit jeweils zwei Detailaufnahmen.

Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome sind stark vaskularisiert. Nekrosezonen sind selten. Besonders im Tumorrandbereich finden sich häufig auffallend dilatierete Gefäße. In der Regel sind die Melanome von multiplen Gefäßen chaotisch durchsetzt. Teilweise ist der reguläre Endothelaufbau zerstört und große Ansammlungen von Erythrozyten finden sich ungeordnet zwischen den Tumorzellen. In einigen Melanomen zeigt sich ein angiotropes Wachstumsmuster, in dem die Gefäße regelrecht von Melanomzellen „ummauert“ werden (Abb. 12).

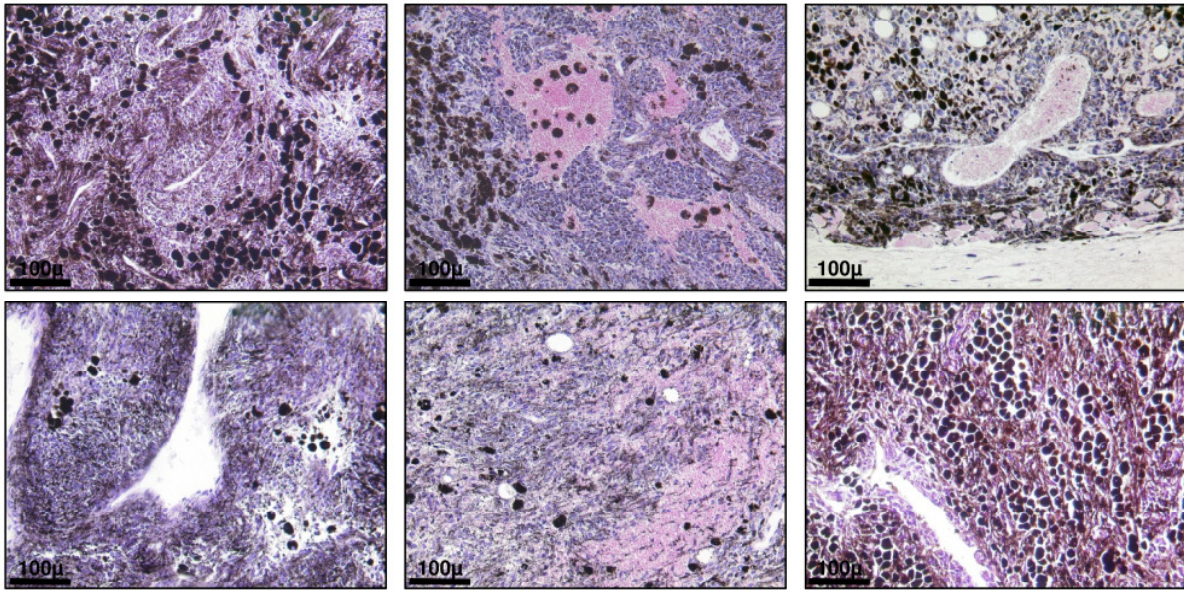
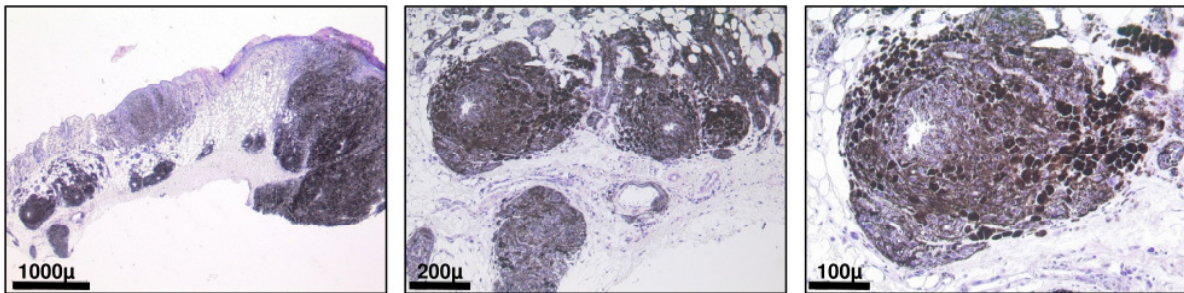
A**B**

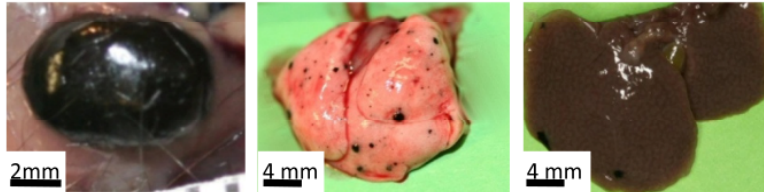
Abb. 12: Histomorphologische Variabilität der Vaskularisation in Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. A. H&E gefärbte Ausschnitte aus 6 verschiedenen Melanomen. B. Übersicht eines Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms mit zwei Deteilaufnahmen mit angiotropen Melanomwachstum.

3.1.2 Metastasierungsmuster spontaner Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome

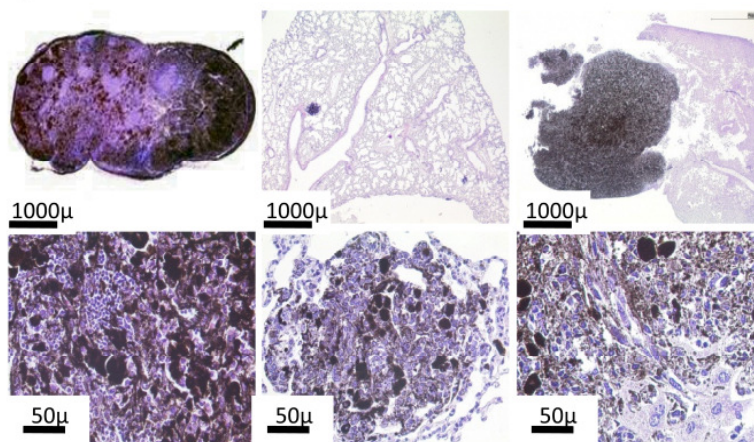
Alle Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome metastasieren in den drainierenden Lymphknoten. Die drainierenden Lymphknoten sind makroskopisch vergrößert. Histologisch infiltrieren die Melanomzellen vom Randsinus aus die T-Zell-reichen Lymphknotenregionen. Die B-Lymphozyten-reichen-Areale (Lymphfollikel) werden meist ausgespart. In 49% findet man makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen. Drei Mäuse zeigten auch Metastasen in anderen Viszeralorganen wie Leber, Niere und Milz. Histomorphologisch findet man in den Metastasen wie im Primärtumor sowohl stark pigmentierte, epitheloide als auch kaum pigmentierte spindelige Tumorzellen. Der melanozytäre Ursprung der metastasierten Melanomzellen wurde durch eine immunhistochemische Färbung gegen das Melanozyten-Differenzierungsantigen TRP-1 (Tyrosin-related protein 1) verifiziert. Die Ausprägung der Metastasierung in die Lunge ist abhängig von der Wachstumskinetik des kutanen Melanoms. Mäuse mit rasch wachsendem

nodulären Melanom zeigten in 66% makroskopisch sichtbare Metastasen der Lunge. Dagen hatten nur 50% der Mäuse mit langsam wachsendem Melanom und 25% der Mäuse mit oberflächlich wachsendem Melanom Makrometastasen der Lunge (Abb. 13). Hirnmetastasen wurden keine beobachtet.

A



B



C

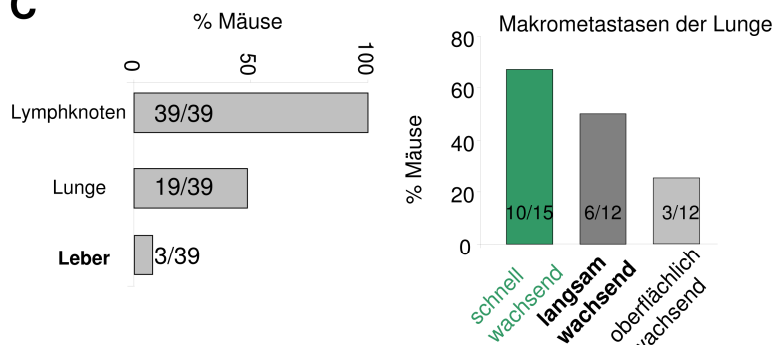


Abb. 13.: Primär kutane Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome metastasieren in Lymphknoten und Viszeralorgane. A. Von links nach rechts: typische makroskopische Bilder eines vergrößerten, pigmentierten Lymphknotens, pigmentierte Knoten in der Lunge und Leber einer Hgf-Cdk4^{R24C} Maus mit einem kutanen Melanom. B. Korrespondierende H&E gefärbte Schnitte mit einer Vergrößerung von 25x (oben) und 400x (unten). C. Links: Prozent von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=39) mit makroskopisch sichtbaren Lymphknoten, Lungen- und Lebermetastasen. Rechts: Makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen in Abhängigkeit von der Tumorstadiumskinetik in 39 Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.

3.1.3 Immuntoleranz im Mikromilieu spontaner Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome

Primäre kutane Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome wachsen progressiv, neigen zu Ulzeration und zeigen im H&E Schnitt keine nachweisbaren lymphozytären Infiltrationen. Auch immunhistochemische und Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen nur vereinzelt CD45⁺ Immunzellen innerhalb des Tumors. Durchflusszytometrische Analysen bestätigen, dass die meisten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome (69%, 11 von 16 Melanomen) in Abwesenheit von CD45⁺ Immunzellen wachsen. 5

Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome von 16 (31%) zeigten durchflusszytometrisch jedoch eine CD45⁺ Immunzellpopulation von > 6 % (bis max. 17%) im Tumormikromilieu (Abb. 14). Durch die histomorphologische Korrelation und immunhistochemische Färbungen konnte diese Zellpopulation als Gr1⁺CD11b⁺ Granulozyten identifiziert werden. Diese befanden sich fast ausschließlich in der Ulzerationszone. Gr1⁻CD11b⁺ Makrophagen, MHCII⁺CD11c⁺ dendritischen Zellen (Daten nicht dargestellt), sowie CD8⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen fanden sich nur sehr vereinzelt innerhalb des Tumors.

Eine weitere Charakterisierung des Tumormikromilieus erfolgte mittels quantitativer RT-PCR im Vergleich zu Cdk4^{R24C} Haut und Hgf-Cdk4^{R24C} Nävi (Abb. 14D). Die starke Expression der melanosomalen Enzyme gp100 (Si) und Trp2 (Dtc) und des Transkriptionsfaktors MITF (microphthalmia-associated transcription factor) bestätigten die Anwesenheit einer großen Anzahl von pigmentierten Melanomzellen im Tumor. Das proinflammatorische Zytokin CXCL10 (Chemokine (C-X-C Motiv) ligand 10 oder IP10 = Interferon- γ -induziertes Protein), das vor allem chemotaktisch auf T-Zellen, Makrophagen, NK Zellen und dendritische Zellen wirkt, zeigt ähnliche Expressionslevel wie normale Haut. Hingegen zeigen sich signifikant erhöhte Expressionslevel des Zytokins CXCL-2, das strukturell und funktionell dem humanen Interleukin-8 homolog ist und von Melanomzellen als autokriner Wachstumsfaktor produziert werden kann (Shao et al., 1998; Richmond et al., 2009). CXCL2 wirkt pro-angiogenetisch und dient der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.

Diese Daten unterstützen die Beobachtung, dass Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome in einem Tumormikromilieu ohne zytotoxische Entzündung progressiv wachsen und damit intrinsischen Abwehr- und Erkennungsmechanismen des Immunsystems wirksam ausweichen können.

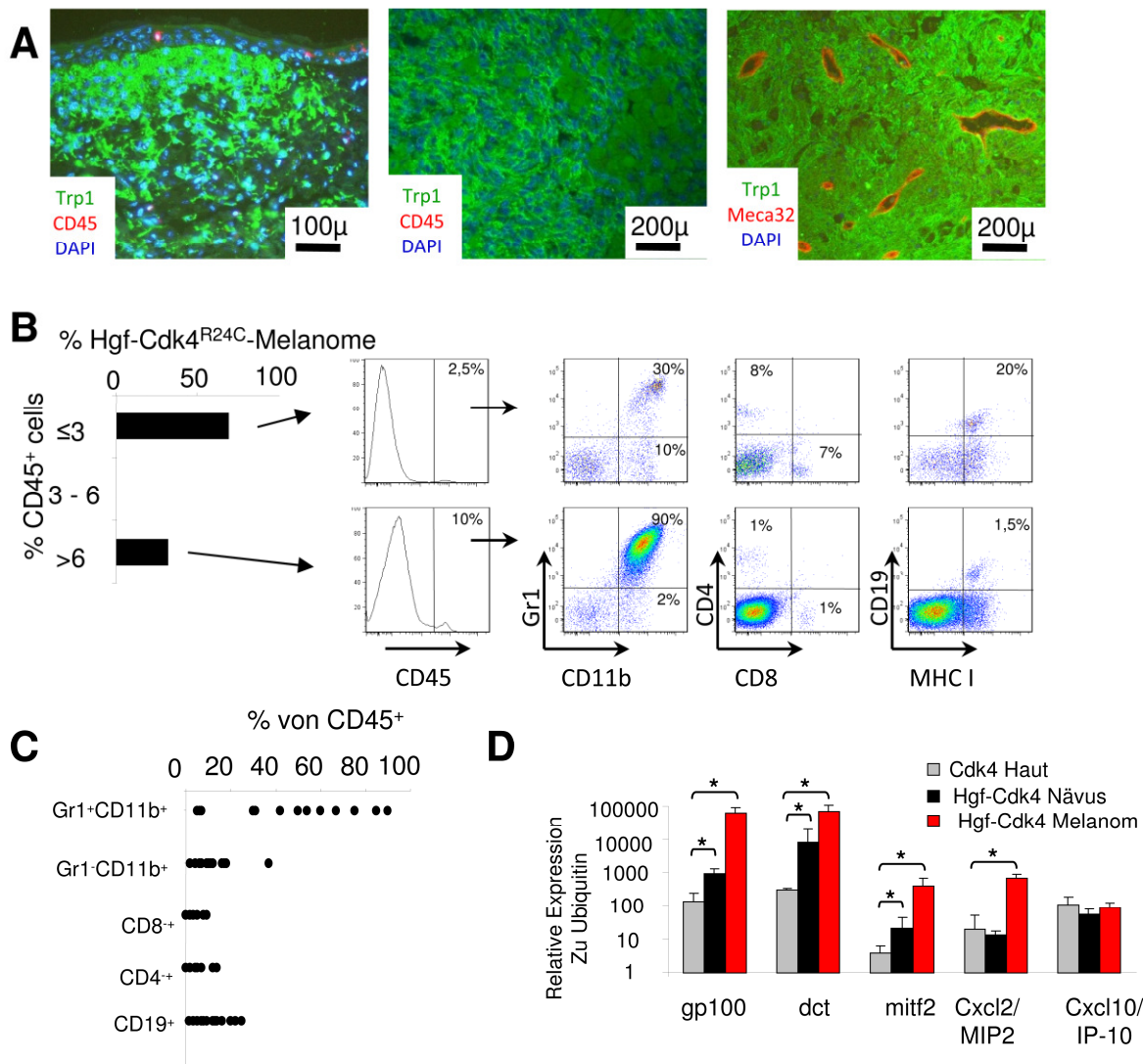


Abb. 14: Analyse der Immunzell-Rekrutierung in primär kutanen Hgf-CDK4^{R24C} Melanomen: A. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme für CD45⁺ Immunzellen (rot), Trp1 (grün) und DAPI (blau). Links: Dermo-epidermale Junctionszone. Mitte: zentrale Tumorzone eines Hgf-CDK4^{R24C} Melanoms. Rechts: Immunfluoreszenzaufnahme der Gefäße innerhalb des Tumors mit Meca32 (rot) und Trp1 (grün). **B.** Durchflusszytometrisch gemessener Anteil von CD45⁺ Immunzellen in Prozent im Tumorlysat (n=16) sowie repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen für Granulozyten, T- und B-Zellen, gegatet auf CD45⁺ Immunzellen eines nicht-ulzerierten Melanoms (oben) und eines ulzerierten Melanoms (unten). **C.** Durchflusszytometrische Analyse der CD45⁺ Immunzellen. **D.** Ergebnisse der RT-PCR für gp100, dct, mitf2 und Cxcl2 und Cxcl10 (n=5). Angezeigt ist die mittlere relative Expression zu Ubiquitin (±SEM, * = p < 0,05).

3.1.4 Invasion metastasierender Melanomzellen in T-Zell-reiche Areale des drainierenden Lymphknoten ohne eine Aktivierung von dendritischen Zellen

Hgf-CDK4^{R24C} Melanomzellen metastasieren in den drainierenden Lymphknoten und infiltrieren dort vom Randsinus aus die T-Zell-reichen Gebiete ähnlich wie humane Melanomzellen. Immunfluoreszenz-Analysen zeigen die Trp1 positiven Melanomzellen im direkten Kontakt zu

CD45⁺Immunzellen. Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigen die Anwesenheit einer CD45⁻ Zellpopulation im drainierenden Lymphknoten, die den metastasierenden Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomzellen entspricht. Diese zeigen wie der Primärtumor eine geringe MHC Klasse I Expression. Metastatisch infiltrierte Lymphknoten primärer Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome zeigen in Relation zu Lymphknoten tumorfreier Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse eine signifikant geringe Anzahl an T-Zellen, vor allem CD8⁺ Zellen, sowie eine reduzierte Anzahl von Antigen-präsentierenden CD11c⁺ Zellen ($p^* < 0,05$). Dendritische Zellen zeigen keine Zeichen der Aktivierung wie die Hochregulation des kostimulierenden Moleküls CD86 (Abb. 15). Dies zeigt, dass Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomzellen einer Erkennung durch das zelluläre Immunsystem durch eine geringe MHC Klasse I Molekül Expression sowie durch insuffiziente Aktivierung von dendritischen Zellen umgehen können.

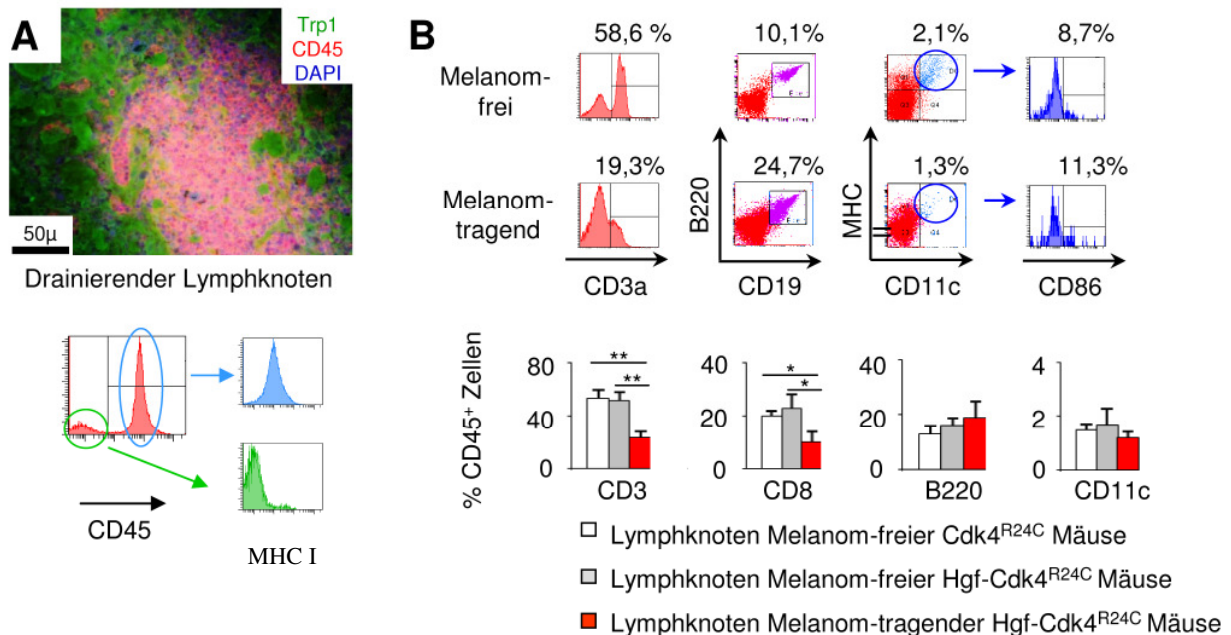


Abb. 15: Metastasierende Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomzellen verdrängen im drainierenden Lymphknoten T-Zellen ohne eine Aktivierung von dendritischen Zellen

A. Analyse der drainierenden Lymphknoten. Oben: Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahme. Grün: Färbung für Trp1, rot: Färbung für CD45, blau: DAPI. Unten: Repräsentative Histogramme zur Quantifizierung der CD45⁻ und MHC I- Tumorzellen. **B.** Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lymphozyten im drainierenden Lymphknoten. Oben: Repräsentative Histogramme und Dot plots für die angegebenen Marker. Unten: Kumulative Ergebnisse der Anteile verschiedener Zellpopulationen (+/- sem) im metastasierten Lymphknoten von Tumor-tragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=15), Tumor-freien Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=5) und Tumor-freien Cdk4^{R24C} Mäusen (n=5) (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.1.5 Extramedulläre Hämatopoese und Rekrutierung immaturer myeloider Suppressor-Zellen in die Milz während der Tumorprogression

82% (32/39) der tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse zeigen eine Splenomegalie mit > 1,5 cm Länge. Histologisch zeichnen sich diese Milzen durch eine Aufhebung der physiologischen Milzarchitektur und der Ansammlung von Megakaryozyten als große z.T. mehrkernige Zellen mit basophilen Zytoplasma aus. Durchflusszytometrisch konnte ein deutlicher Rückgang der CD45⁺ Zellen auf bis zu 40% CD45⁺ Zellen im Vergleich zu 90% bei nicht tumortragenden Tieren nachgewiesen werden. Der Rückgang der CD45⁺ Zellen korreliert mit einer erhöhten Expression des Markers Ter119 für Erythropoese. Das Ausmaß der extramedullären Hämatopoese korreliert außerdem mit einem Anstieg von myeloiden Suppressor Zellen (MDSCs), charakterisiert durch die Expression von Gr-1 und CD11b. In tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen sind 5-17 % der CD45⁺-Zellen Gr1⁺CD11b⁺ Zellen im Vergleich zu 1-3% in nicht tumortragenden Tieren. Die Tumorentstehung führt zu einer signifikanten Reduktion von CD4⁺, CD8⁺ und CD19⁺ Zellen in der Milz ($p < 0,05$). Auch im Knochenmark von tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen findet sich ein signifikanter Anstieg von MDSCs ($66 \pm 4\%$ versus $40 \pm 8\%$ der CD45⁺ Zellen) und ein Rückgang von CD19⁺ Zellen ($5 \pm 3\%$ versus $15 \pm 2\%$ der CD45⁺ Zellen) (Abb. 16). Die Melanomprogression in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen ist mit der Anreicherung von myeloiden Suppressor Zellen und dem gleichzeitigen Rückgang von B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie einer Reduktion von T-Zellen in der Milz assoziiert. Dies stellt einen möglichen immunsuppressiven Mechanismus im Rahmen der Tumorprogression dar.

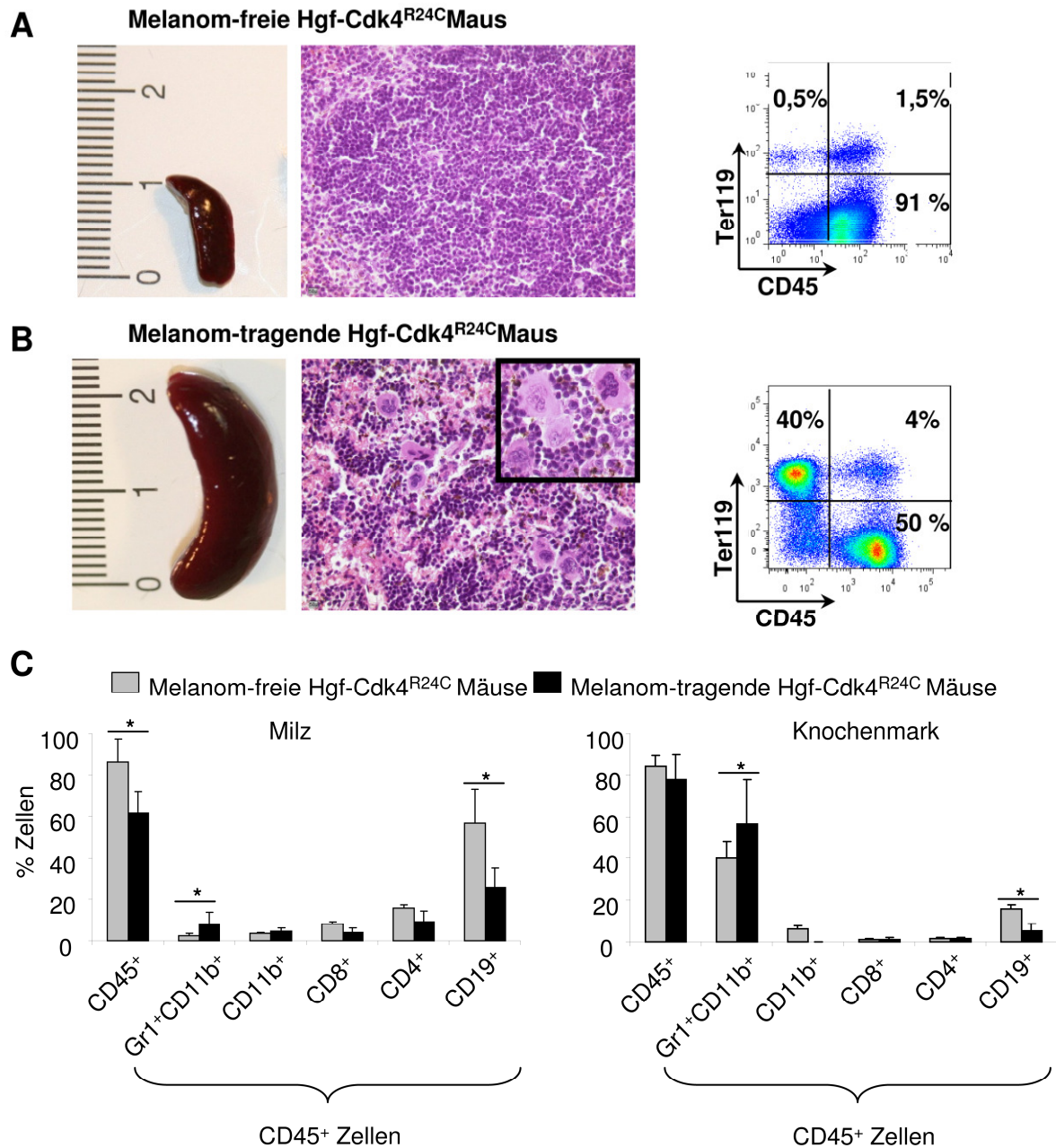


Abb. 16: Extramedulläre Hämatopoese in Melanom-tragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen

A. Makroskopie und H&E gefärbte Mikroskopie der Milz einer gesunden Hgf-Cdk4^{R24C} Maus. Rechts: Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten der gleichen Maus: Repräsentativer Dot-Plot für Ter119⁺ und CD45⁺ Zellen in der Milz. B. Korrespondierende Makro- und Mikroskopie sowie ein repräsentativer Dot-Plot für Ter119⁺ und CD45⁺ Zellen in der Milz einer Melanom-tragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Maus. C. Durchflusszytometrische Charakterisierung der CD45⁺ Immunzell-Populationen in der Milz (links) und im Knochenmark (rechts) von Melanom-tragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=6) und Tumor-freien Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=6) (* = p < 0,05).

3.1.6 Normale Immunzell-Rekrutierung in primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkome

Um einen generellen Defekt der Immunzell-Rekrutierung in primäre Tumoren von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen auszuschließen, wurden primäre Sarkome induziert. Diese Tumore zeigen typischerweise

eine ausgeprägte Tumor-assoziierte Entzündung. 2-3 Monate nach intrakutaner Injektion von 400 µg Methylcholanthren (MCA) in die rechte Flanke von 6 Wochen alten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen erschienen Tumore etwas früher als in den Kontrollgruppen von Cdk4^{R24C} (n=8) und Wildtyp-Mäusen (n=5). In allen Mäusen entstanden primäre Sarkome mit vollständiger Penetranz. Immunhistochemisch zeigen primäre Sarkome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen eine deutliche Infiltration mit CD45⁺ Immunzellen. Durchflusszytometrisch konnte eine große Anzahl von Gr⁻CD11b⁺ Makrophagen und Gr⁺CD11b⁺ myeloiden Zellen im Tumor-Mikromilieu der Sarkome identifiziert werden. Primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkome wachsen in einem Tumor-Mikromilieu mit inflammatorischer Immunzellrekrutierung (Abb. 17). Diese Daten sprechen gegen einen generellen Defekt der Rekrutierung von Immunzellen in Tumore von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.

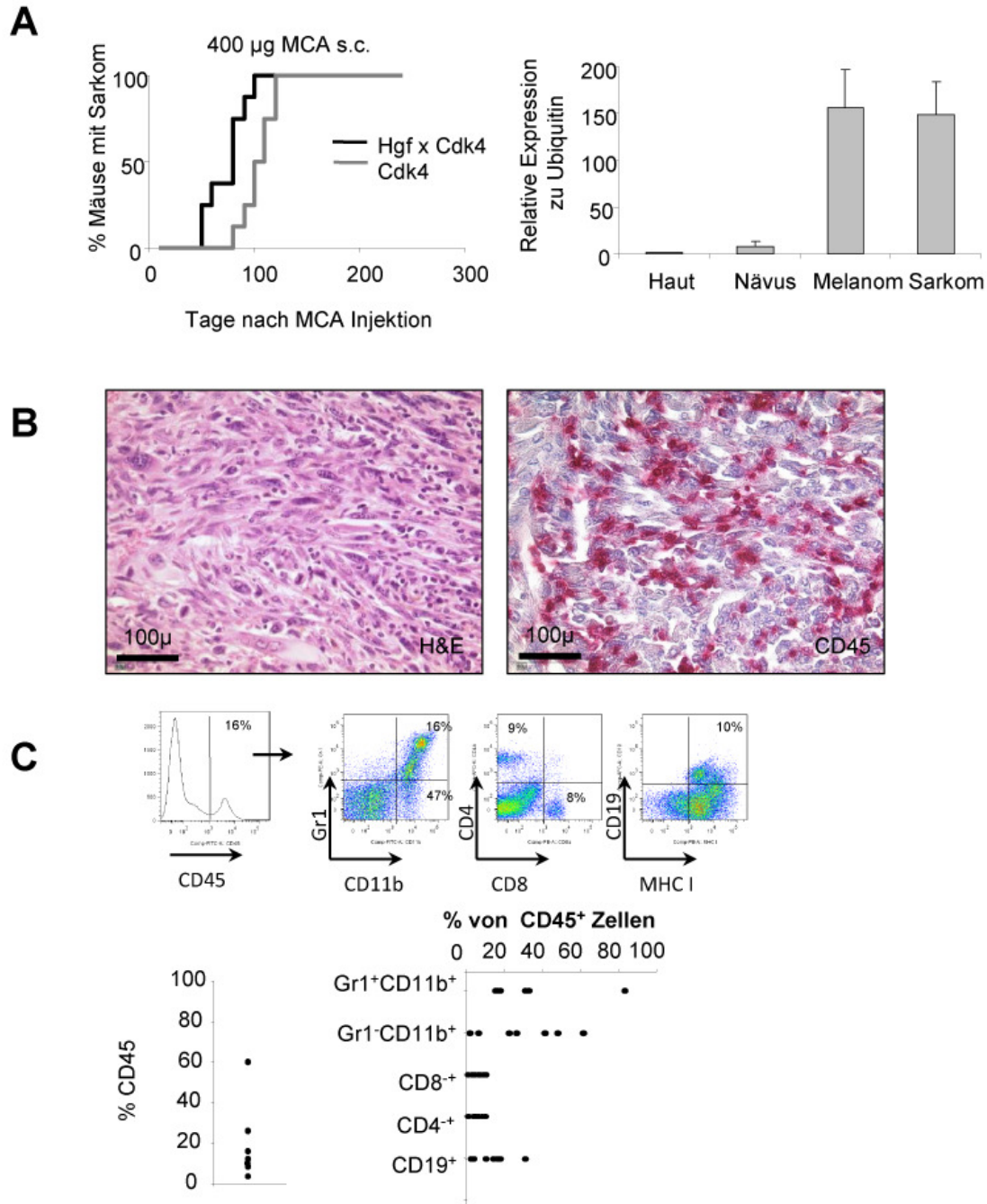


Abb. 17.: Primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkome wachsen im Gegensatz zu primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen in einem Mikromilieu mit einer Tumor assoziierten inflammatorischen Immunzellrekrutierung

A. Links: Kaplan-Meier Kurven zur Sarkominzidenz nach subkutaner Injektion von Methylcholanthren in Hgf-Cdk4 (n=8) und Cdk4 (n=5) Mäusen. Rechts: Ergebnisse der RT-PCR für Hgf (n=3). **B.** Links: repräsentatives histologisches (H&E gefärbt) Bild eines primären karzinogen (Methylcholanthren) induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkoms. Rechts: Immunhistochemische Färbung für CD45.

B. Durchflusszytometrische Analyse eines primären Karzinogen induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkoms. Oben: Repräsentatives Histogramm der CD45⁺ Zellen sowie Dotplots zur Quantifizierung der CD45⁺ Zellen in myeloide, T- und B-Zellen. Unten: Kumulative Ergebnisse der Anteile verschiedener Zellpopulationen in MCA-induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkomen (n=7).

3.2 Wirkung einer neonatalen UVB-Bestrahlung auf die Melanomenentstehung und – progression in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen

3.2.1 Verminderte Latenz der Melanomenstehung nach neonataler UVB-Bestrahlung

Um den Einfluss einer neonatalen UVB-Bestrahlung auf die Tumorenstehung in Hgf und Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen auf dem C57BL/6 Hintergrund zu untersuchen, behandelten wir neugeborene Mäuse am 3. oder 4. Lebenstag mit einer minimalen Erythemdosis von 6 kJ/m² und beobachteten die Entwicklung von Hauttumoren über einen Zeitraum von 600 Tagen. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von G. Merlino (Noonan et al., 2000) beschleunigt eine einmalige neonatale UVB-Bestrahlung die Entstehung von primär kutanen Melanomen in Hgf und Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. UVB-bestrahlte Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse entwickelten nach 229 ± 65 Tagen progressiv wachsende Melanome. In unbehandelten Tieren entstehen Melanome durchschnittlich 40 Tage später (269 ± 66; p = 0,04) (Abb. 18). Der Effekt einer dreimaligen UVB Bestrahlung von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen mit jeweils 6 kJ/m² am 3., 4. und 5. Lebenstag unterschied sich nicht von dem einer einmaligen Bestrahlung (Daten nicht dargestellt).

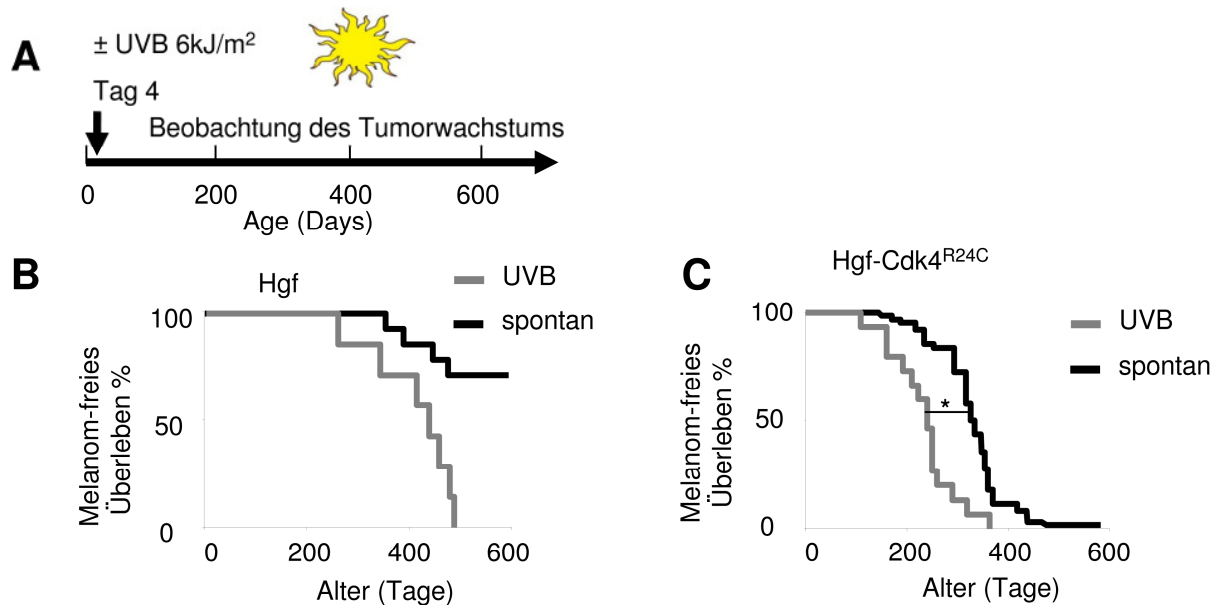


Abb. 18: Einfluss einer neonatalen UVB-Bestrahlung auf die Entwicklung primärer Melanome in Hgf und Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. A. Behandlungsschema der UVB-Bestrahlung B. Kaplan-Meier-Kurven für das Melanom-freie Überleben in UVB-behandelten (grau, n=10) und unbehandelten (schwarz, n=10) Hgf C57BL/6 Mäusen. C. Kaplan-Meier-Kurven für das Melanom-freie Überleben in UVB-behandelten (grau, n=15) und unbehandelten (schwarz, n=30) Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen) (** = p < 0,01).

Die Lokalisation der UVB-induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome ist wie bei den spontan auftretenden Melanomen inhomogen. 11 von 15 Mäusen (73%) entwickelten am Rücken ein Melanom. 3 Mäuse (20%) am Bauch und 1 Maus (7%) zeigte im Analbereich ein progressiv

wachsendes Melanom. Alle UVB-induzierten Melanome wuchsen rasch nodulär. Oberflächlich flach wachsende Melanome wurden in der Gruppe der 15 UVB-bestrahlten Hgf-Cdk4^{R24C} Tiere nicht beobachtet (Abb. 19).

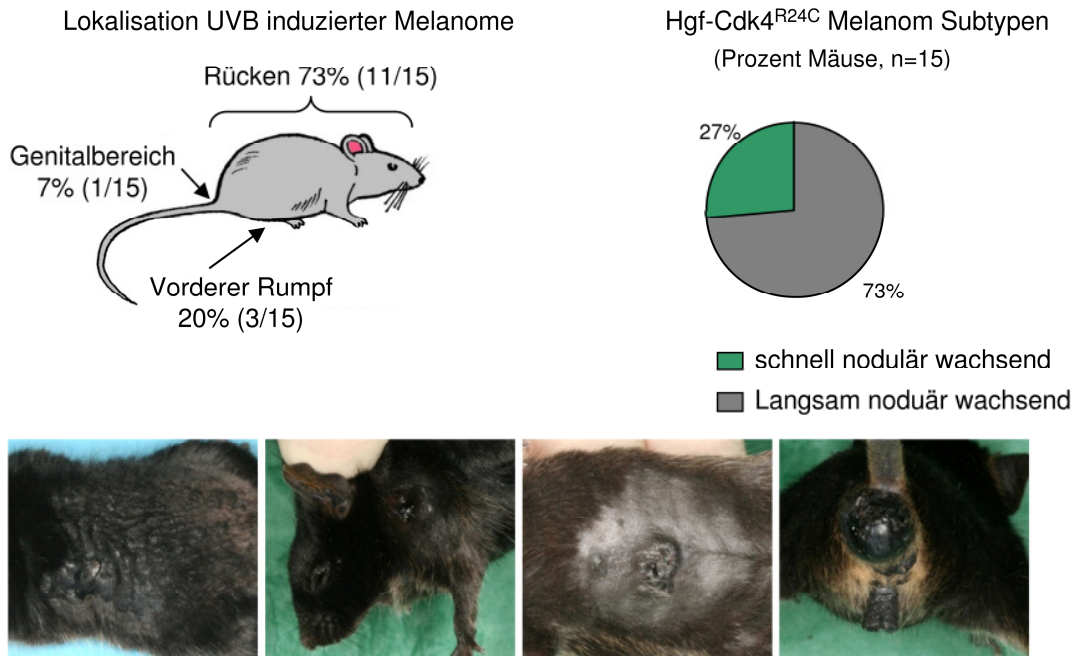


Abb. 19: Makroskopische Analyse von UVB-induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. Oben links: Lokalisation von UVB-induzierten Melanomen in 15 Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Oben rechts: Einteilung der UVB-induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome nach Kinetik. Unten: Repräsentative makroskopische Bilder von UVB-induzierten Melanomen. Von links nach rechts: Rücken, Schulter, Bauch und Analbereich.

Ähnlich wie eine UVB-Bestrahlung induziert das Karzinogen DMBA rasch progressiv wachsende noduläre Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Eine einmalige neonatale Applikation von 40µg DMBA auf die Rückenhaut von in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen führt innerhalb von 8-10 Wochen zu multiplen nodulär wachsenden kutanen Melanomen. In einem Alter von 94 ± 8 Tagen müssen die behandelten Mäuse aufgrund von 15 ± 8 progressiv wachsenden Melanomen geopfert werden (n=12) (Abb. 20). Die Applikation von 25µg DMBA reduziert die Anzahl der Melanome auf 5 ± 3 (n=10). Die Zeit bis zur Melanomentstehung war unverändert. Cdk4^{R24C} Mäuse entwickeln nach einmaliger DMBA-Behandlung keine melanozytären Veränderungen.

3.2.2 Beschleunigtes Wachstum und verstärkte Lungenmetastasierung UVB-induzierter Melanome

Die UVB-Bestrahlung verstärkt das Auftreten von nodulären Melanomen mit schneller Wachstumskinetik, so dass diese Mäuse früher getötet werden müssen. Sie leben nach Auftreten des ersten Tumors signifikant kürzer als unbehandelte Hgf-Cdk4^{R24C} Tiere (61 ± 30 Tage versus 96

Tage ± 58 , $p < 0,05$). Auch die Gesamtüberlebenszeit der Tiere ist verkürzt (304 ± 79 Tagen versus 370 ± 93 Tage, $p = 0,004$) (Abb. 20). Nävi entstehen in UVB-bestrahlten und unbehandelten Tieren im gleichen Lebensalter (219 ± 65 versus 209 ± 35 , $p > 0,05$). Neonatal mit DMBA behandelte Tiere entwickeln keine Nävi. Jede melanozytäre Läsion wächst progressiv zu einem nodulären Melanom mit rascher Wachstumskinetik, so dass diese Tiere bereits 30 ± 12 Tage nach Auftreten des ersten Melanoms (55 ± 13 Lebenstage) geopfert werden (Abb. 20). DMBA- und UVB-induzierte Melanome metastasieren wie spontane Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen in den drainierenden Lymphknoten. Makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen lassen sich signifikant häufiger in DMBA- und UVB-behandelten Tieren finden. Nach DMBA-Behandlung zeigen 11 von 13 Mäusen (85%) zum Todeszeitpunkt (94 ± 8 Lebenstage) Lungenmetastasen. Interessanterweise findet man bereits am 65. Lebenstage, wenn die Melanome gerade makroskopisch sichtbar sind, bereits in 5 von 8 Mäusen (63%) Lungenmetastasen. Dies spricht für eine frühzeitige hämatogene Metastasierung in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. In UVB behandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen lassen sich zum Todeszeitpunkt in 7 von 10 Mäusen (70%) makroskopische Metastasen der Lunge nachweisen (Abb. 21).

Histomorphologisch unterscheiden sich DMBA- und UVB-induzierte primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome nicht von spontanen nodulären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen aus unbehandelten Mäusen (Abb. 22). Jedoch zeigen unbehandelte Mäuse neben nodulären auch oberflächlich wachsende Melanome, so dass sich ein heterogeneres Spektrum von melanozytären Tumoren ergibt. DMBA- und UVB-induzierte Melanome zeigen in der Gesamtheit daher einen aggressiveren Phänotyp mit verstärkter Invasivität.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine einmalige DMBA- oder UVB-Behandlung die Aggressivität primär kutaner Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen erhöht.

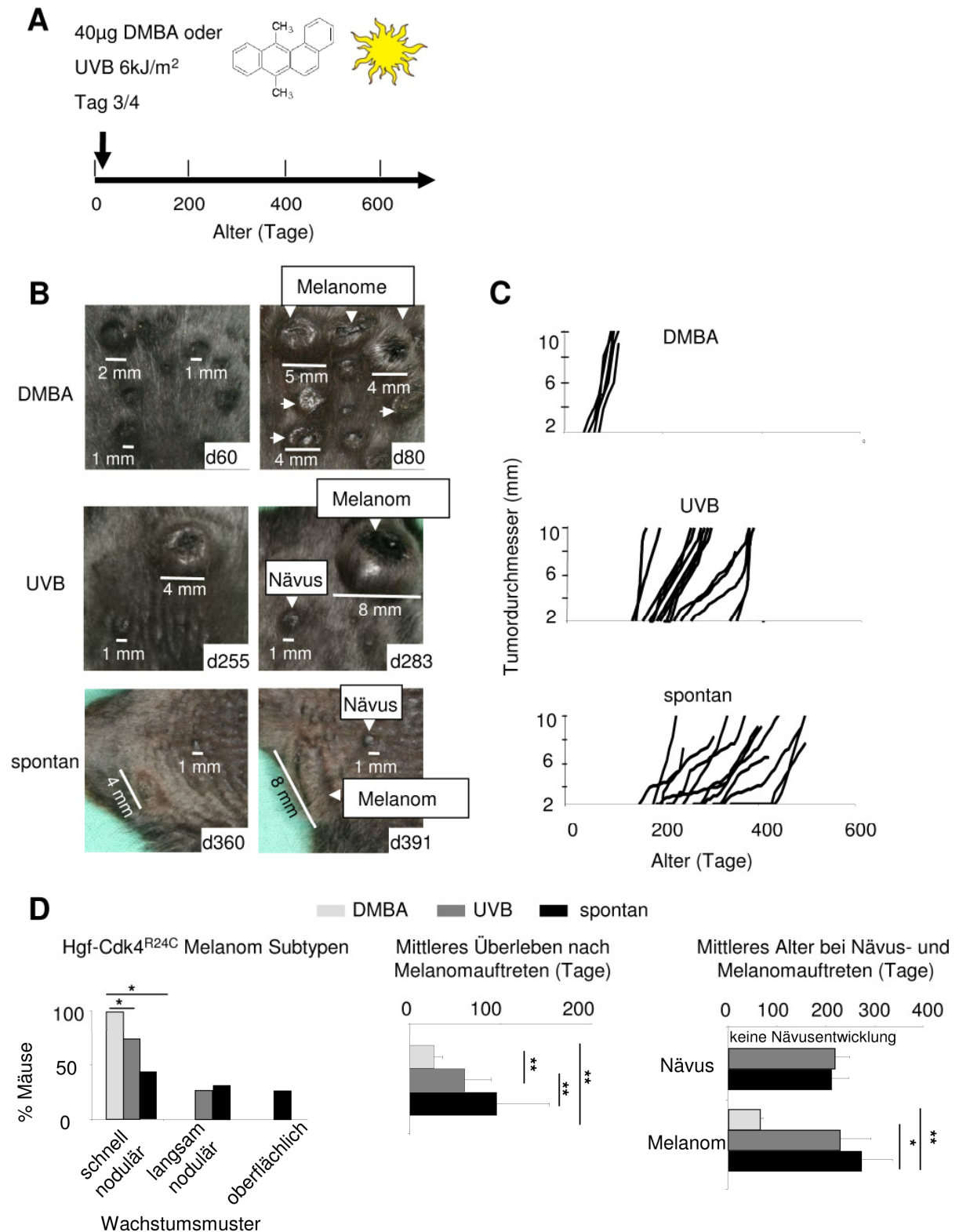


Abb. 20: Einfluss einer einmaligen neonatalen UVB-Bestrahlung im Vergleich zur Applikation des Karzinogens DMBA auf die Wachstumskinetik von melanozytären Tumoren in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.

A. Behandlungsschema der UVB-Bestrahlung oder der epikutanen Applikation des Karzinogens DMBA (Dimethylbenzanthren) am 3.-4. Lebenstag. B. Repräsentative makroskopische Bilder einer DMBA – behandelten (oben), UVB-behandelten (Mitte) und unbehandelten (unten) Hgf-Cdk4^{R24C} Maus zu jeweils zwei verschiedenen Zeitpunkten. C. Korrespondierende Tumorstadiumskinetiken. Dargestellt sind

die Tumordurchmesser des größten Tumors individueller Mäuse (UVB n=12, DMBA n=10, spontan n=12). D. Links: Verteilung der Melanom Subtypen in DMBA- (hellgrau, n= 12), UVB- (dunkelgrau, n=15) und unbehandelten (schwarz, n=30) Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Mitte: Mittleres Überleben zwischen Auftreten des Melanoms und Tod in Tagen in DMBA-, UVB- und unbehandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Rechts: Mittleres Alter bei Auftreten des ersten Nävus und Melanoms in Tagen in in DMBA-, UVB- und unbehandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen) (* = p < 0,05; ** = p < 0,01).

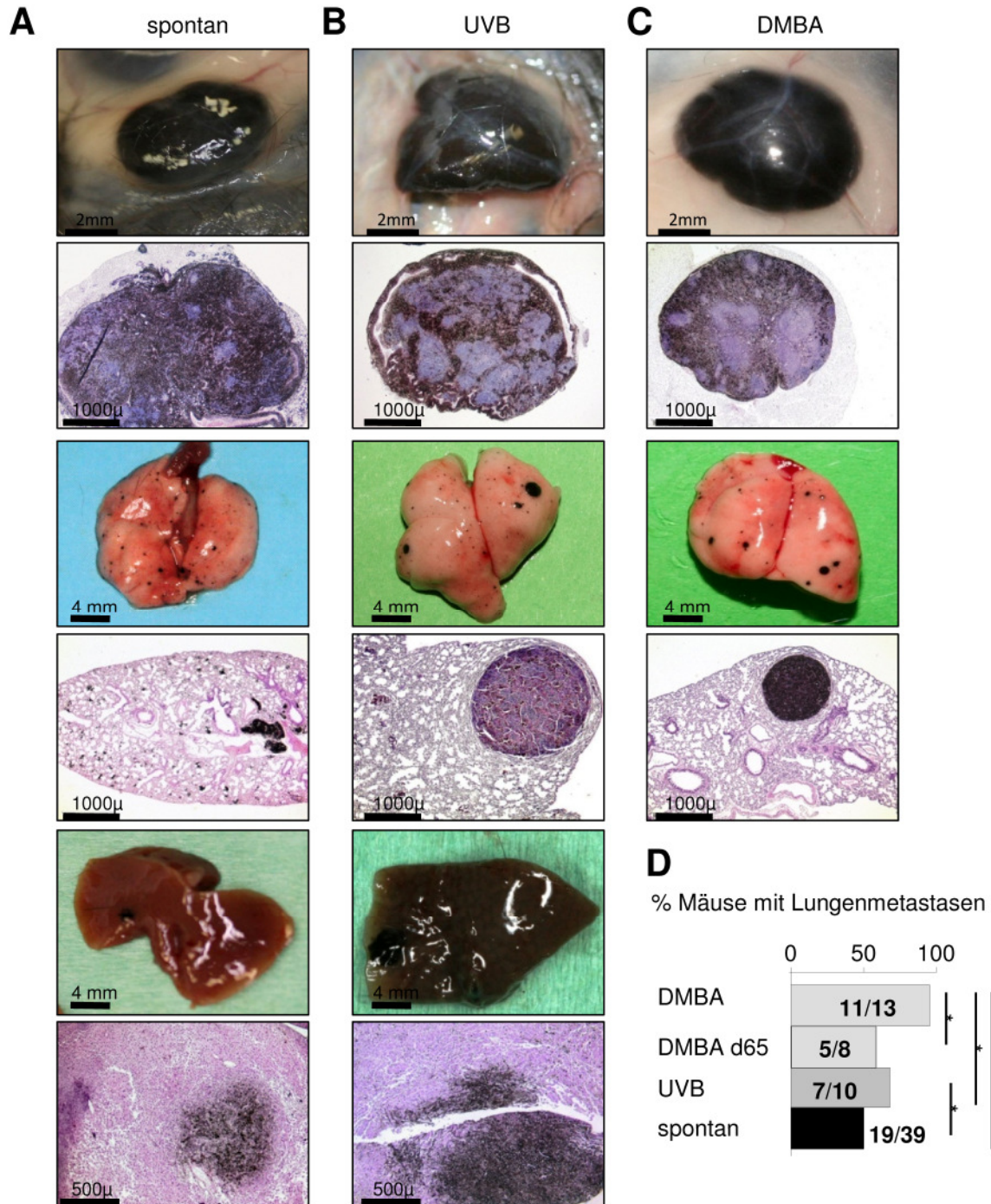


Abb. 21: Eine einmalige neonatale UVB-Bestrahlung oder die Applikation des Karzinogens DMBA erhöht die Inzidenz von Lungenmetastasen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.

A. Repräsentative makroskopische und mikroskopische Bilder spontaner Metastasen eines primär kutanen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms: Von oben nach unten: Drainierender Lymphknoten, Lunge und Leber, jeweils

Makroskopie und H&E gefärbte Mikroskopie. B. Zum Vergleich Metastasen eines UVB induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms. D. Metastasen eines DMBA induzierten primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms. D. Prozent an Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen mit makroskopisch sichtbaren Lungenmetastasen in DMBA-behandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zum Todeszeitpunkt (n=13) und im Alter von 65 Tagen (n=8), sowie in UVB- (n=10) und unbehandelten (n=39) Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen) (* = p < 0,05).

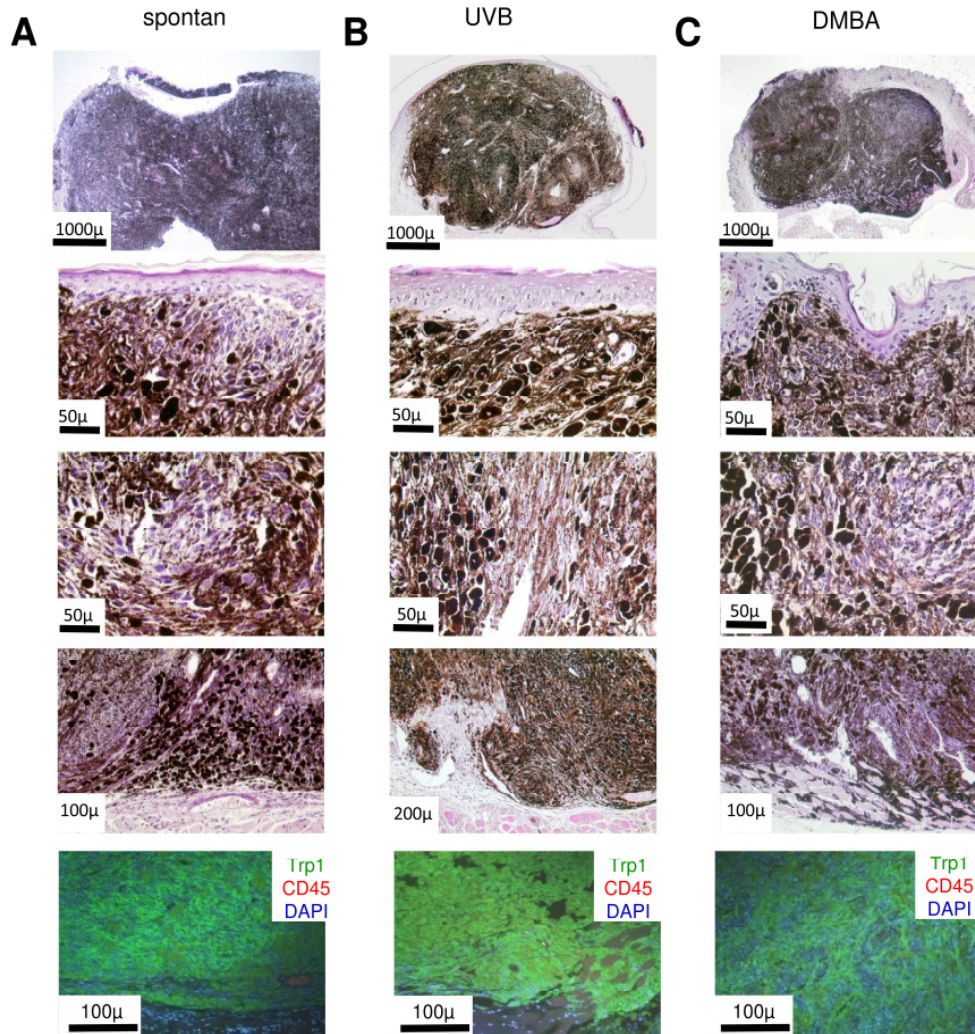


Abb. 22: Noduläre Melanome von UVB- und DMBA-behandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen lassen sich histomorphologisch nicht von Melanomen unbehandelter Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse unterscheiden

A. Repräsentative mikroskopische Bilder eines spontanen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms. Von oben nach unten: Überblick eines typischen nodulär, invasiv wachsenden Melanoms (Vergrößerung 25x), Miteinbeziehung der dermo-epidermalen Junktionszone Aufbau aus stark pigmentierten, epitheloidartigen und weniger pigmentierten, spindelizellartigen Tumorzellen (Vergrößerung 400x) und ausgeprägter Angiogenese im Tumorrandbereich (Vergrößerung 200x). Unten: Immunfluoreszenz zur Analyse tumorinfiltrierender CD45+ Immunzellen (rot). Färbung der Melanomzellen in grün mit Trp1. Dapi (blau) als Kernfärbung. B. Zum Vergleich ein UVB-induziertes primäres Hgf-Cdk4^{R24C} Melanom. C. Histomorphologie eines DMBA-induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms.

3.2.3 Immuntoleranz im Tumormikromilieu

Aus anderen genetischen Maus-Tumor-Modellen ist bekannt, dass invasives Wachstum und Angiogenese mit einem inflammatorischen Tumormikromilieu assoziiert sind (de Visser et al., 2005). UVB- und DMBA-induzierte primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome zeigen immunhistologisch jedoch, ähnlich wie spontane Melanome, kaum Tumor-infiltrierende CD45⁺ Immunzellen (Abb. 22). Durchflusszytometrische Analysen bestätigen diese Beobachtung (Abb. 23). Auch molekularpathologische Untersuchungen des Tumormikromilieus zeigen niedrige Expressionslevel von proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen. Die Genexpressionslevel des antinflammatorischen Zytokins Tgf β , der melanozytären Markergene gp100 und Trp2 (dct) sowie des Invasionsmarkers spp1 (Osteopontin) sind vergleichsweise hoch, unterscheiden jedoch nicht zwischen DMBA-, UVB oder unbehandelten Melanomen (Abb. 24). Das beschleunigte Melanomwachstum und die verstärkte Metastasierung nach UVB- oder DMBA-Behandlung beruhen folglich nicht auf einer persistierenden tumor-assoziierten proinflammatorischen Entzündung in primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen.

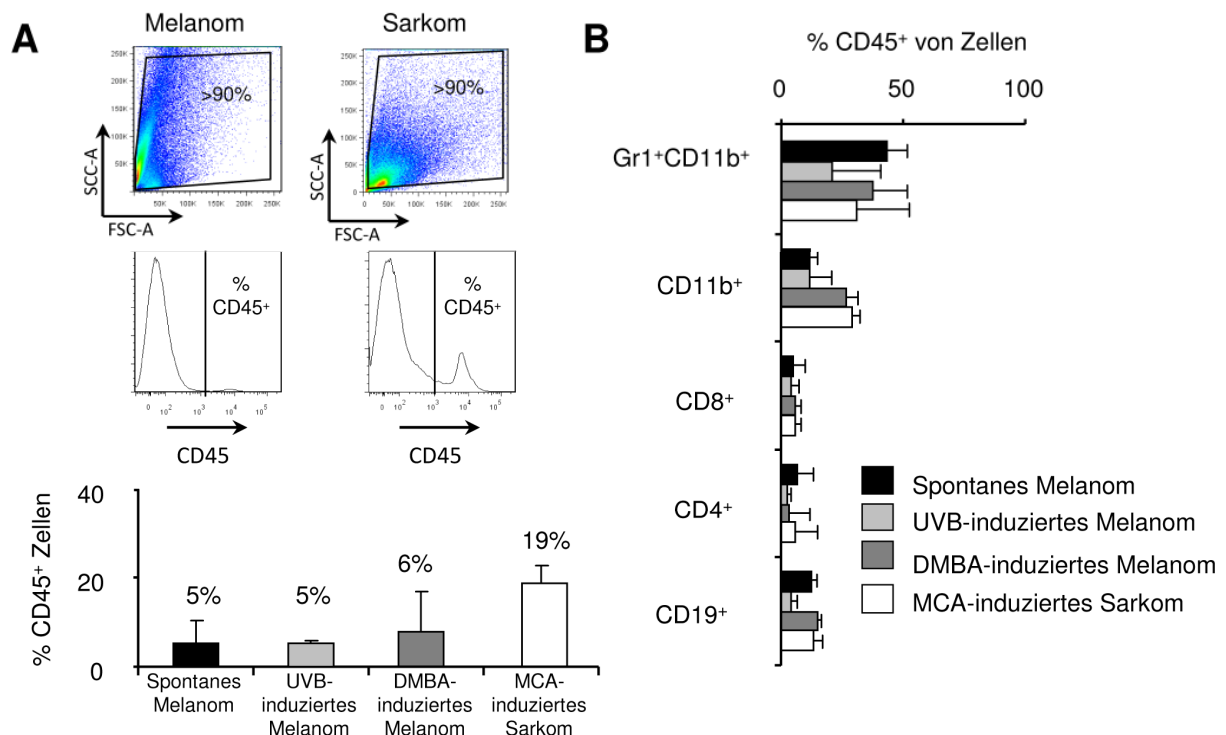


Abb. 23: Durchflusszytometrische Analyse der Tumor-infiltrierenden Immunzellen von spontanen, UVB und DMBA induzierten Melanomen sowie MCA induzierten primären Sarkomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. A. Oben: Repräsentative durchflusszytometrische Abbildung eines typischen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms im Vergleich zu einem Hgf-Cdk4^{R24C} Sarkom. Histogramm des Anteiles der CD45⁺ Population an der Gesamtpopulation. Unten: Kumulativer prozentualer Anteil von CD45⁺ Immunzellen im Tumorlysat. Spontane Melanome (n=16), UVB-induzierte Melanome (n=4), DMBA induzierte Melanome

(n=7) und MCA induzierte Sarkome (n=7) in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. B. Kumulative Ergebnisse verschiedener Zellpopulationanteile der CD45+ Immunzellen.

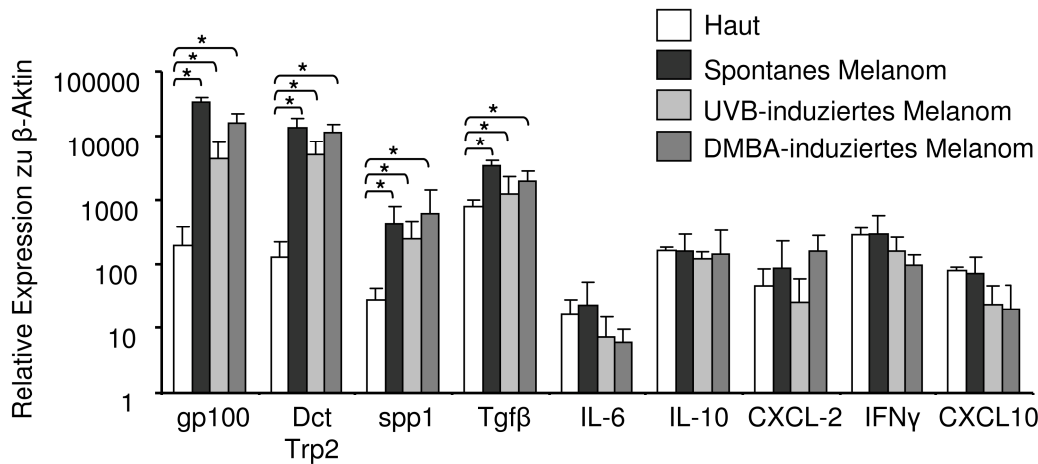


Abb. 24: Molekulare Analyse des Tumormikromilieus von spontanen, UVB- und DMBA-induzierten Melanomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen im Vergleich zu normaler Haut.

RT-PCR-Ergebnisse für die angegebenen Gene von Haut, spontanen, UVB- und DMBA induzierten Melanomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=4),

3.3 Analyse der Tumorprogression nach experimentell induzierter, T-Zell-vermittelter Immunüberwachung in primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen

3.3.1 Regression primärer Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome

Die Interaktion von spontanen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen mit einer tumorspezifischen T-Zell vermittelten Immunüberwachung wurde experimentell durch die Anwendung eines von der Arbeitsgruppe etablierten adoptiven Transfer von T-Zell Rezeptor transgenen T-Zellen aus pmel-1 Mäusen in Kombination mit einer Chemotherapie und einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems untersucht (Kohlmeyer et al., 2009). Die adoptiv transferierten CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkennen spezifisch das melanosomale Proteinen gp100, das von Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird. Zur Optimierung ihrer Effektorfunktion erhielten die Mäuse, das in Vorarbeiten etablierte Protokoll mit einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid („C“) vor der Injektion von pmel-1 T-Zellen und deren Aktivierung durch Vakzinierung mit einem rekombinanten adenoviralen Vektor für das humane gp100 („LV“) und einer anschließenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die repetitive peritumorale Injektion von immunstimulatorischen Oligonukleotiden („I“). Eine Kohorte von 15 Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen mit einem einzelnen nodulären Melanom von 5 mm Durchmesser erhielt zwei Therapiezyklen analog des „C+LV+I“-Protokolls. Um zu überprüfen, ob die transferierten

CD8⁺ T-Zellen den Tumor infiltrieren können, wurde eine Maus 10 Tage nach der Intervention geopfert. Immunfluoreszenzaufnahmen des primären Melanoms bestätigen die starke Infiltration von CD45⁺ Immunzellen im Vergleich zu unbehandelten primären Melanomen. Die behandelten Tiere lebten signifikant länger mit 441 (± 74) im Vergleich zu 351 (± 81) Lebenstagen der Kontrollgruppe ($p = 0,009$) (Abb.25). Primäre Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome können von adoptiv transferrierten tumorspezifischen T-Zellen erkannt und zerstört werden. Diese T-Zell-vermittelte Immunüberwachung verlängert signifikant das Gesamtüberleben von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.

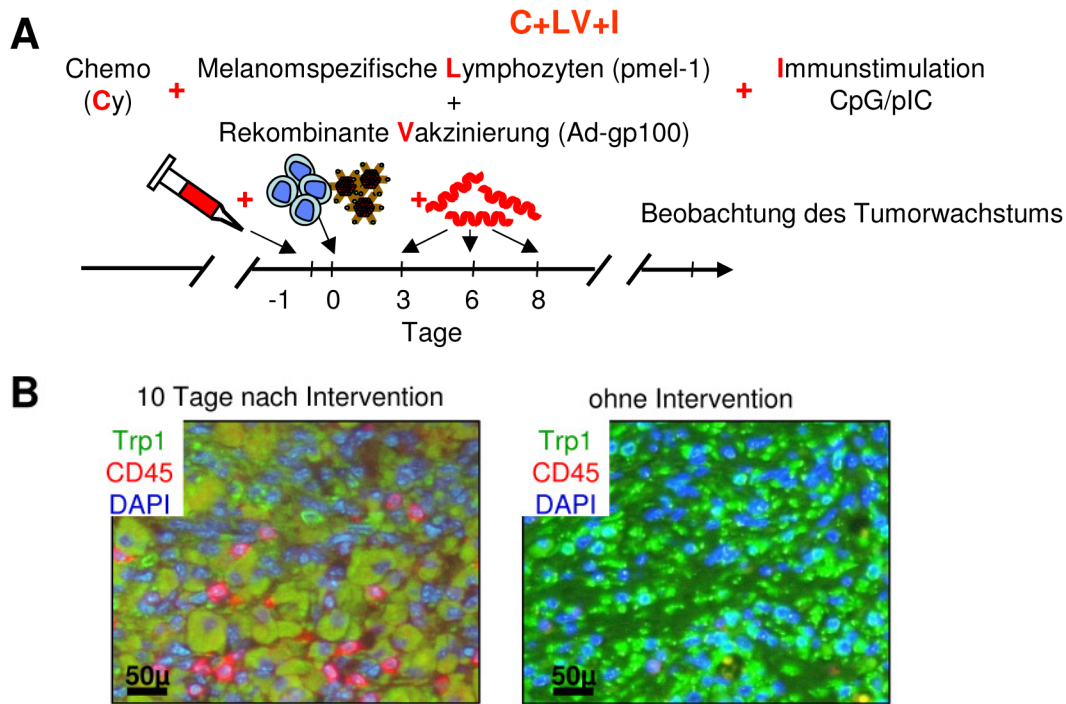


Abb. 25: Experimentelle Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung

A. Behandlungsprotokoll. Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse mit spontanen Melanomen wurden in zwei Gruppen randomisiert. Eine Gruppe erhielt zwei Zyklen eine Chemotherapie (C) vor einem adoptiven Transfer von pmel-1 T Lymphozyten mit viraler Vakzinierung mit Ad-gp100 (LV + I) gefolgt von peritumoraler Injektion von CpG und Poly I:C bei einem Primärtumordurchmesser von 5 mm ($n=14$). Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung ($n=43$). B. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von primären Melanomen zur Analyse tumorinfiltrierender CD45⁺ Immunzellen (rot) 10 Tage nach Intervention (links) und ohne Intervention (rechts).

3.3.2 Immun-Escape primärer Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome

Nach zwei Therapiezyklen wurde das Tumorwachstum von 14 Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen beobachtet. In 9 Tieren konnte eine komplette, in 2 Tieren eine partielle Tumorregression und in den verbleibenden 3 Tieren ein stabiler Tumorverlauf beobachtet werden. Zwei Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse verstarben nach kompletter Remission mehr als 140 Tage nach Therapie im Alter von 422 und 488 Tagen ohne primäre Melanome. Bei den übrigen Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen konnte etwa 80 Tage nach therapeutischer Intervention ein lokales Wiederauftreten des Melanoms beobachtet werden

(Abb. 26). Sechs Mäuse zeigten im Verlauf Zeichen einer Vitiligo-ähnlichen Hypopigmentierung der Haut und des Fells als Zeichen einer Erkennung und Zerstörung von transformierten Melanozyten. Das Ausmaß der Vitiligo ähnlichen Haut- und Fellveränderungen korrelierte mit der Melanomregression. Primäre Hgf-Cdk4^{R24C} können nach Destruktion durch eine T-Zell-vermittelte Immunüberwachung diese umgehen und lokal wieder auftreten.

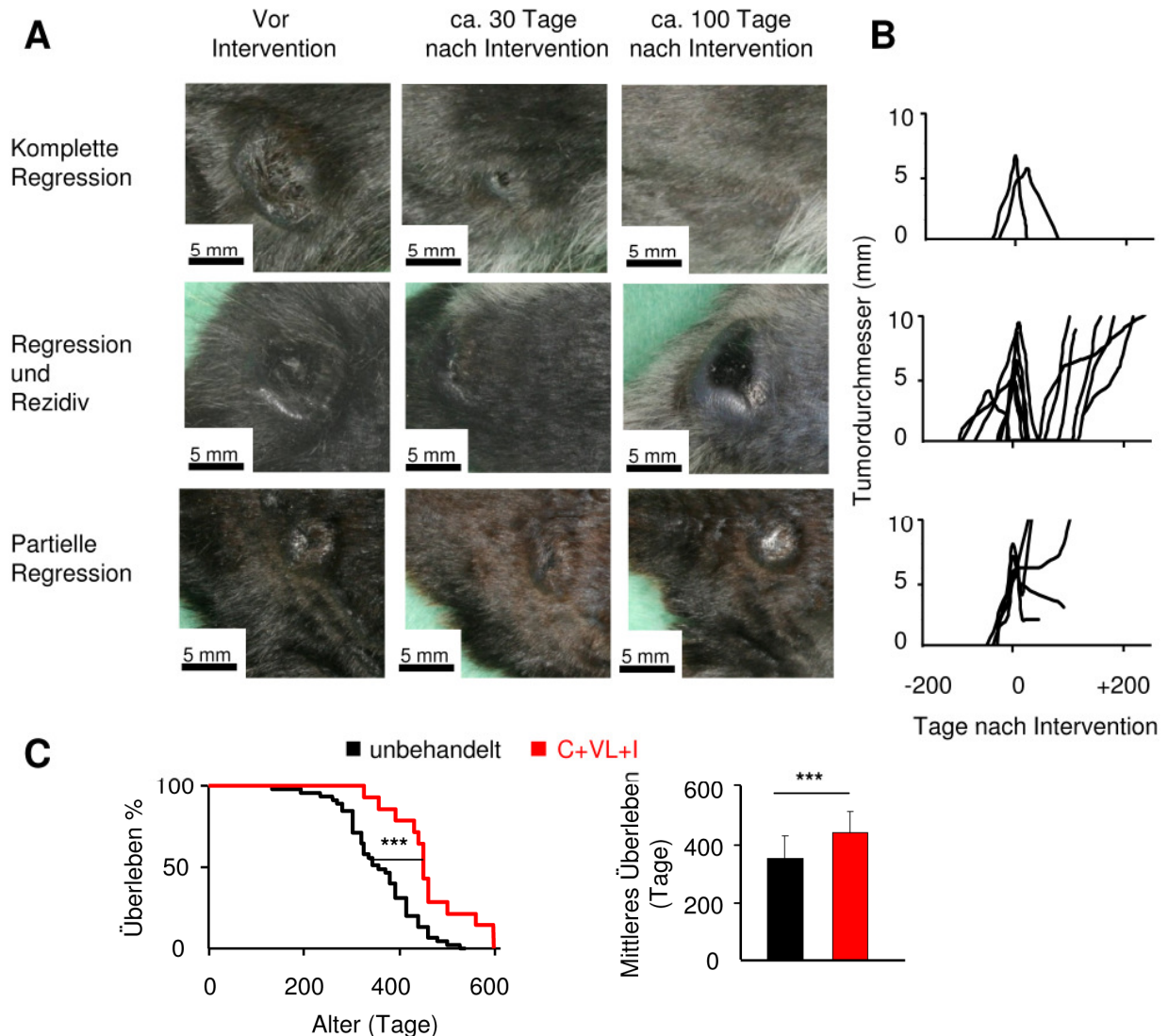


Abb. 26: Einfluss einer experimentell induzierten, T-Zell-vermittelten Immunüberwachung auf das Tumorstadium

A. Repräsentative makroskopische Bilder von jeweils drei "C+LV+I" behandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen vor und nach der Intervention. Von oben nach unten: Komplette Regression (oben), lokales Wiederauftreten nach kompletter Regression (Mitte) und partielle Regression von spontanen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. B. Tumorstadiumskinetiken individueller Mäuse vor und nach Intervention (n=14). C. Kaplan-Meier-Überlebenskurve (links) und mittlere Überlebenszeit in Tagen (rechts) der behandelten und unbehandelten Kohorte (*** = p < 0,001).

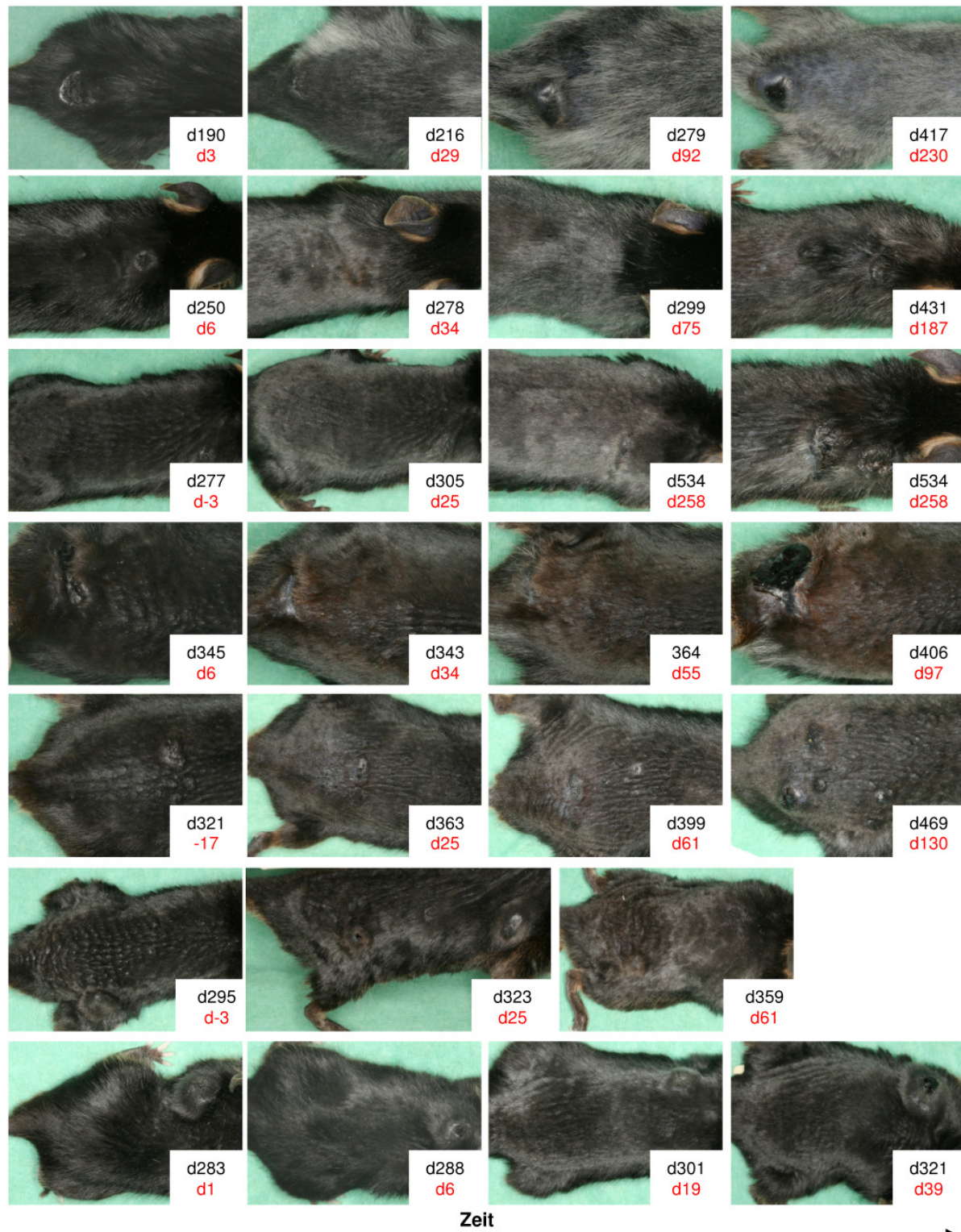


Abb. 27: Tumorwachstum in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen vor und nach T-Zell-vermittelten Immunüberwachung: Repräsentative makroskopische Bilder der Rücken von 7 verschiedenen Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (Lebensalter in schwarzen Ziffern, Tage nach Therapie in rot)

3.3.3 Proliferation entdifferenzierter Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomzellen in einem proinflammatorischen Mikromilieu

Histomorphologisch zeigen 40% (4/10) der rekurrenten Melanome großflächige Areale mit hypo- und amelanotischen Tumorzellen. Ähnliche histomorphologische Bilder können sehr selten (3/61) auch in unbehandelten Melanomen auftreten (Abb. 11). Die übrigen rekurrenten Melanome zeigen die typische Histomorphologie von unbehandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen mit einer variablen Zusammensetzung von stark pigmentierten, epitheloiden und weniger stark pigmentierten, spindelförmigen Tumorzellen. Vitiligo ähnliche Haut- und Fellveränderungen korrelierten nicht mit dem Auftreten von amelanotischen Tumorarealen. Die rekurrenten Melanome zeichnen sich durch eine vermehrte Infiltration von CD45⁺ und Gr1⁺ Immunzellen aus. Amelanotische Tumorzellen in Metastasen von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen mit rekurrenten Melanom wurden nicht beobachtet (Abb. 28). Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigen die Persistenz von transferrierten pmel-1 T-Zellen in geringem Prozentsatz in Milz, Blut und Tumorgewebe (Daten nicht dargestellt).

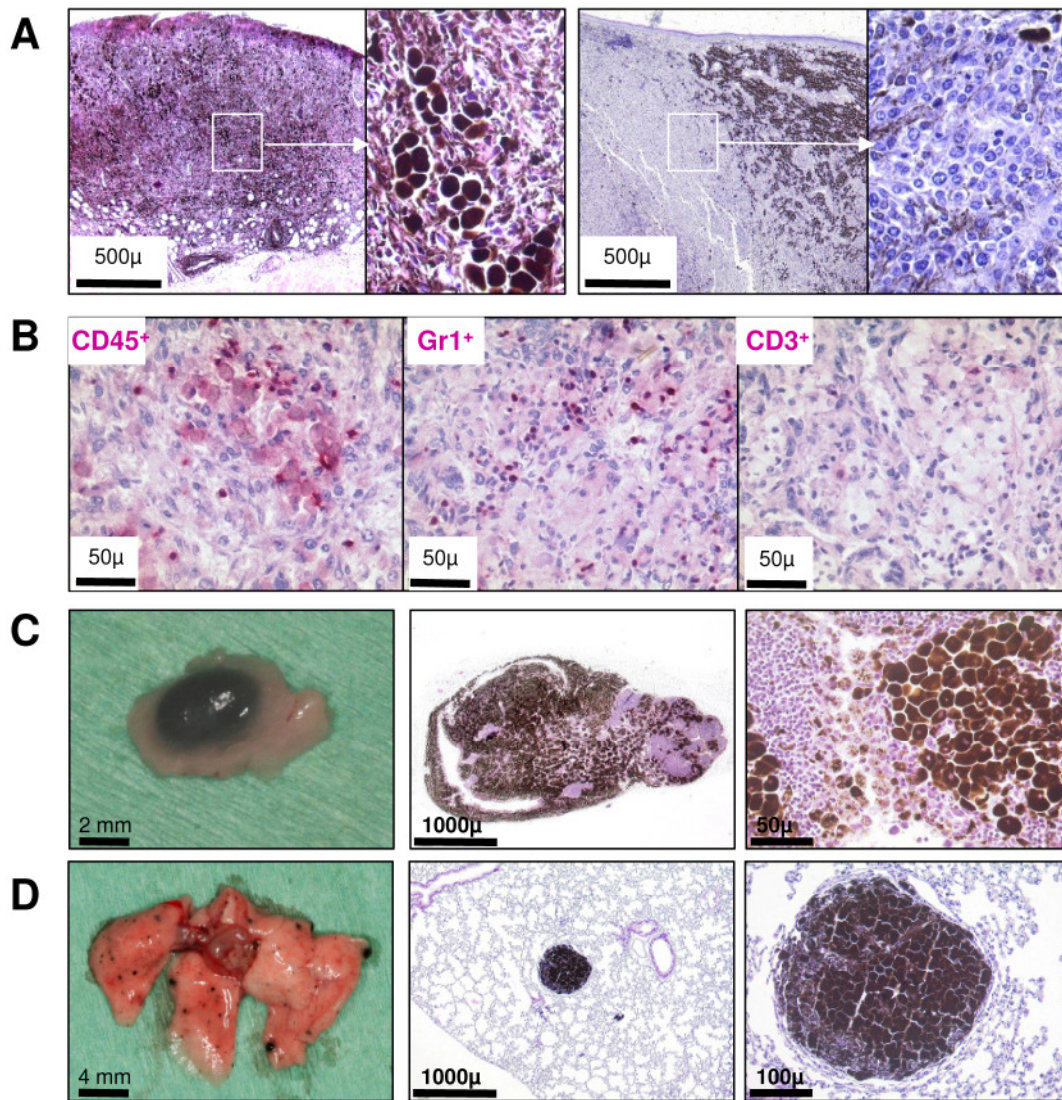


Abb. 28: Morphologie von primären Melanomen und Metastasen nach Umgehung einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung

A. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (H&E gefärbt) von rekurrenten Melanomen mit vorwiegend pigmentierten Tumorzellen (links) und mit vorwiegend hypo- bis apigmentierten Tumorzellen. B. Immunhistochemische Färbungen für CD45⁺ (links), Gr1⁺ (Mitte) und CD3⁺ (rechts) Immunzellen im Zentrum eines rekurrenten Melanoms. C. Makroskopie und Mikroskopie eines drainierenden Lymphknoten einer Hgf-Cdk4^{R24C} Maus mit rekurrentem Melanom. D. Makroskopie und Mikroskopie der Lungenmetastasen der gleichen Maus.

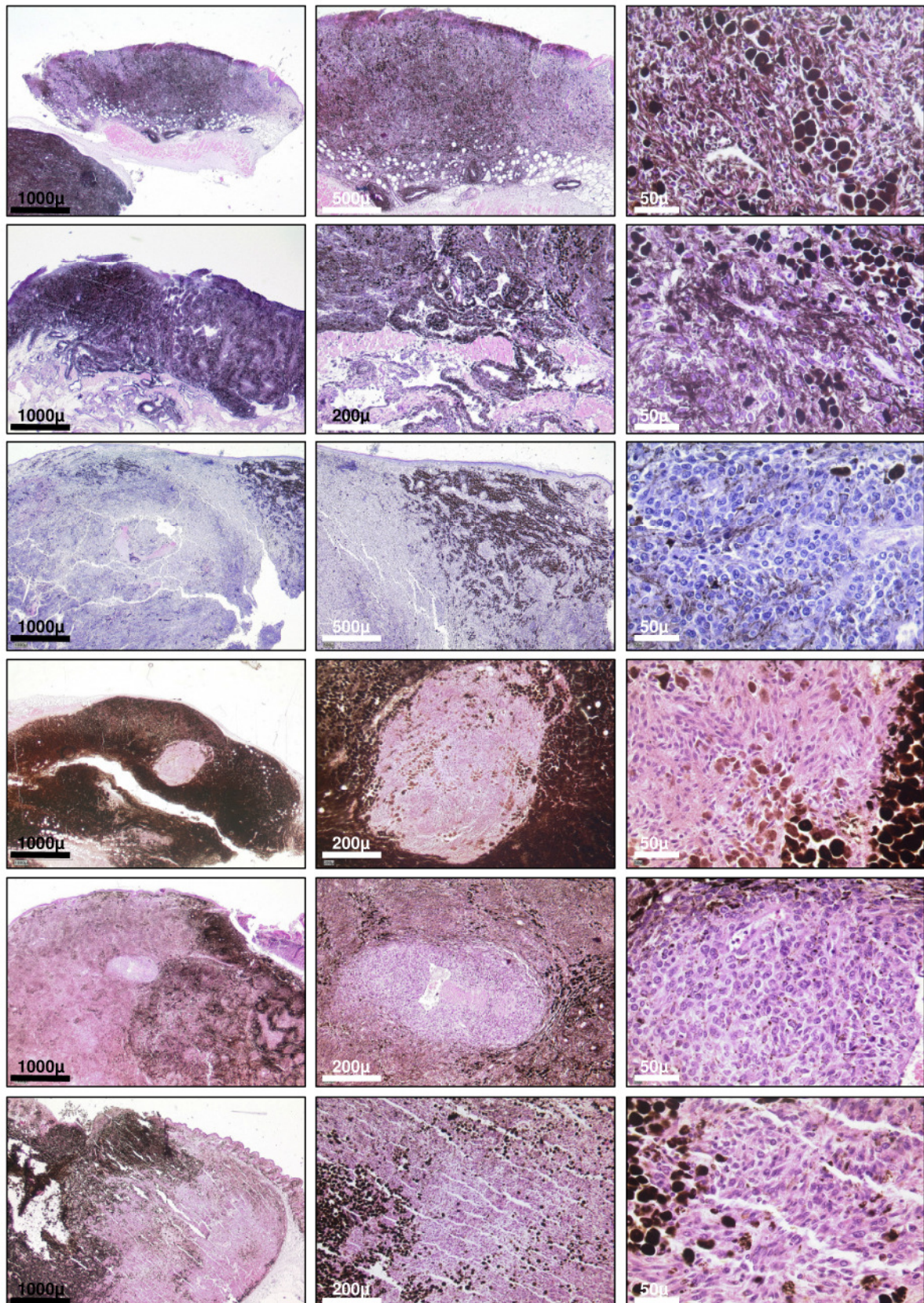


Abb. 29: Morphologie von primären Melanomen und Metastasen nach Umgehung einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung. Von oben nach unten 6 verschiedene H&E gefärbte Melanome im Überblick mit jeweils zwei Detailaufnahmen.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung von Nävi und Melanomen in genetisch veränderten Mausstämmen

Die hier durchgeführten Arbeiten im genetischen Hgf-Cdk4^{R24C} Modell der Maus haben gezeigt, dass eine Aktivierung der Ras-Raf Signaltransduktion in Kombination mit einer Hemmung der p16-abhängigen Zellzykluskontrolle die Entstehung maligner Melanome begünstigt. Obwohl in allen Zellen Hgf überexprimiert und Cdk4^{R24C} mutiert ist, kommt es selektiv zur malignen Transformation von Melanozyten. Das Hgf-Cdk4^{R24C} Modell imitiert dabei nicht nur die genetischen sondern auch die biologischen Charakteristika der humanen Melanompathogenese: Es entstehen Nävi, progressiv wachsende primäre Melanome und schließlich Metastasen in lokoregionären Lymphknoten und Lungen. Die Hypothese der schrittweisen Melanomenstehung vom Nävus zum invasiv wachsenden Melanom beim Menschen wurde bereits 1984 von Clark beschrieben (Clark, Jr. et al., 1984). Die meisten Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen treten jedoch spontan ohne melanozytäre Vorläuferläsion auf. Dies ist auch bei den meisten humanen Melanomen der Fall. In nur einem Viertel der Melanompatienten lässt sich ein Nävus histopathologisch oder klinisch als Vorläuferläsion identifizieren (Bevona et al., 2003).

Die Cdk4^{R24C} Mutation vermindert die Latenz und erhöht die Penetranz progressiv wachsender Melanome in Hgf Mäusen. Interessanterweise treten trotz des p16^{Ink4a} Funktionsverlustes zahlreiche Nävi auf. Eine ähnliche Beobachtung wurde kürzlich in Braf^{+/V600E:Tyr::CreERT2} Mäusen beschrieben. In diesen Mäusen lässt sich das mutierte Braf^{V600E} Protein durch Tamoxifen-Applikation auf die Haut selektiv in Melanozyten induzieren. Innerhalb weniger Wochen entstehen daraufhin multiple Nävi. Durch zusätzliche Deletion des Cdkn2a-Lokus, p16 oder PTEN kommt es in diesen Mäusen vermehrt zu Melanomen (Goel et al., 2009; Dhomen et al., 2009; Dankort et al., 2009). Nävi entstehen aber auch in Abwesenheit des Tumorsuppressors p16^{Ink4a}. Diese Beobachtungen zeigen, dass weitere Mechanismen der Tumorsuppression nach Ausfall der p16^{Ink4a}-Cdk4-Interaktion ihre Wirkung in Melanozyten entfalten.

Die überwiegende Lokalisation progressiv wachsender nodulärer Melanome auf dem Rücken ist ein Vorteil des Hgf-Cdk4^{R24C} Maus-Modells. So lässt sich die Tumor-Wachstumskinetik zuverlässig beurteilen und messen. Dadurch grenzt sich das Hgf-Cdk4^{R24C} Mausmodell von anderen genetischen Modellen wie z.B. dem Ras-Ink4A, Ret- und Grm1-Modell ab. In diesen Modellen entwickeln sich die Melanome fast ausschließlich in den haarlosen bzw. haararmen Regionen wie z.B. an den Ohren, der Schnauze, am Schwanz und im Genitalbereich, wo sich

bevorzugt dermale Melanozyten finden. Eine bevorzugte Melanomentstehung in der behaarten Haut findet sich auch in „TiRP Mäusen“ (Huijbers et al., 2006; Soudja et al., 2010).

Primär kutane Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome metastasieren immer in den drainierenden Lymphknoten, häufig in die Lunge und gelegentlich in Leber, Niere und Milz. Hirnmetastasen haben wir in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen nicht beobachtet. Hgf steigert die Motilität von Melanozyten und könnte die ausgeprägte Metastasierung in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen erklären (Damm et al., 2010). Tyr-Hras^{G12V}-Cdk4^{R24C} und „TiRP“-Mäuse, in denen Hras^{G12V} und eine Deletion von p16^{INK4a}/p19^{Arf} durch eine Tamoxifen-induzierte Cre Rekombinase Aktivität spezifisch in den Melanozyten induziert werden, metastasieren in die Lymphknoten, jedoch nicht in die Viszeralorgane (Hacker et al., 2006; Huijbers et al., 2006). MT/Ret-Melanome metastasieren unregelmäßig in die Lymphknoten, Lunge, Niere, Milz sowie vereinzelt in das Gehirn (Kato et al., 1998). Genetische Melanom-Maus-Modelle unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zu metastasieren und es bleibt weiter abzuklären welche Faktoren die Metastasierung beeinflussen.

4.2 Mechanismen der Melanominduktion durch UVB-Bestrahlung

Eine einmalige neonatale UVB-Bestrahlung mit einer Sonnenbrand-induzierenden Dosierung von 6 kJ/m² verstärkte die Melanomentstehung sowohl in Hgf als auch in Hgf-Cdk^{R24C} Mäusen auf dem pigmentierten C57BL6 Hintergrund. Diese Resultate stimmen mit den publizierten Beobachtungen in Hgf Mäusen auf dem Albino FVB Hintergrund überein, bei denen eine einmalige neonatale UVB Bestrahlung die Melanominzidenz von etwa 22% auf bis zu 80% erhöht (Noonan 2001). bei denen eine einmalige neonatale UVB Bestrahlung die Melanominzidenz von etwa 22% auf bis zu 80% erhöht (Noonan 2001). Die zusätzliche genetische Deletion des Tumorsuppressorgen-Lokus Cdkn2a (mit Verlust von p16^{Ink4a} und p19^{Arf}) beschleunigte das Auftreten der UVB-induzierten Tumoren in Albino FVB Mäusen (Recio 2002).

Die Wirkung einer einmaligen neonatalen UVB-Bestrahlung wurde auch in Albino FVB Mäusen mit konstitutiv aktivem, mutiertem Hras in Melanozyten (Tyr-Hras) und einer genetischen Deletion von entweder p19^{Arf} oder p16^{Ink4a} untersucht. Interessanterweise zeigten ausschließlich Arf^{-/-}:Tyr-Hras und nicht p16^{Ink4a}^{-/-}:Tyr-Hras Mäuse eine erhöhte Melanominzidenz nach UVB-Bestrahlung (Kanaan 2003). Die Autoren vermuteten, dass ein defekter p53 Signalweg für die Entwicklung von UVB-induzierten Melanomen notwendig sei. UVB-induzierte Arf^{-/-}:Tyr-Hras

Melanome zeigten zusätzlich Cdk6 Amplifikationen und Ink4a Mutationen, so dass in Tyr-Hras Mäusen die Deregulation des p53 und pRb-Signalweges verantwortlich für die Entstehung von UVB-induzierten Melanomen gemacht wurde. In Tyr-Ras Mäusen auf einem gemischten C3H/SV129 Hintergrund konnte eine einmalige UV-Bestrahlung jedoch Melanome auch in Anwesenheit von p16Ink4a und p19arf induzieren (Hacker et al., 2005).

Die neonatale UVB-Bestrahlung von Hgf-Cdk^{R24C} Mäusen förderte die Progression von primären Melanomen ohne die Entwicklung von Nävi zu beeinflussen. Die Bedeutung von p53 und Arf auf die Melanomprogression wurde kürzlich in Tyr-Nras^{Q61K}-Cdk4^{R24C} Mäusen untersucht, die spontan und nach UVB-Bestrahlung Nävi und Melanome entwickeln. Durch Verlust von p53 oder p19^{arf} entstehen in diesen Mäusen keine Nävi, sondern nur Melanome. Ein Verlust der p53 Funktion scheint den transformierten Melanozyten zu erlauben das Nävusstadium zu umgehen (Ferguson et al., 2010). Diese Hypothese wird durch eine andere kürzlich erschienene Arbeit bestätigt, in der eine p53 Aktivierung in Tyr-ras-Mdm4+/- Mäusen die Transformation von gutartigen melanozytären Tumoren zu malignen und metastastischen Melanomen verhindert (Terzian et al., 2010). Eine persistierende Funktionsbeeinträchtigung bzw. ein Verlust von p53 sind mögliche Mechanismen wie die UV-Bestrahlung die Melanomentstehung und -progression in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen beeinflussen kann, vor allem da UV-Bestrahlung akut eine p53 abhängige DNA-Reparatur Antwort induziert. In Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen konnten wir keine inaktivierenden p53 Mutationen nachweisen. Weitere Untersuchungen der Funktion von p53 stehen noch aus.

UVB-induzierte Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome metastasieren verstärkt in die Lunge. Progression und Metastasierung von Melanomzellen wird mit einer NFκB Aktivierung assoziiert. UV-Strahlung bewirkt in Melanomzellen eine Aktivierung der Transkriptionsfaktor-Familien von NFκB (Ueda und Richmond, 2006). Auch wenn die Abwesenheit eines proinflammatorischen Mikromilieus in Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen gegen eine NFκB Aktivierung im fortgeschrittenen Tumorstadium spricht, ist weiter abzuklären inwieweit ein inflammatorisches Mikromilieu die Tumorinitiation beeinflusst.

Ähnlich wie UVB-Bestrahlung fördert eine einmalige Behandlung mit DMBA die Melanomprogression in Hgf-Cdk^{R24C} Mäusen. Nävi werden nach DMBA-Behandlung nicht beobachtet, denn jede melanozytäre Läsion entwickelt sich zu progressiv wachsenden und

metastasierenden primären Melanomen. Im Vergleich zu anderen genetischen Modellen weisen Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber DMBA auf. Beispielsweise entwickeln Tyr-Hras^{G12V}-transgene (TPras) Mäuse erst nach höheren DMBA-Dosierungen und repetitiven Applikationen zunächst Nävi und dann progressiv wachsende Melanome (Broome et al., 1999). Ein möglicher Mechanismus wie das Karzinogen DMBA zur Melanomprogression beiträgt, ist die Induktion von genetischen Alterationen. Es ist bekannt das DMBA mit der DNA interkaliert und durch spezifische Transversion von A => T im Kodon 61 des Exons 2 auf Chromosom 7 Harvery-ras (Ha-ras) Genmutation induzieren kann (Quintanilla et al., 1986). Sequenzierungsanalysen der Gene H-ras (Kodon 61), N-ras (Kodon 61) und B-raf (Kodon 637, entspricht dem humanen Kodon 600) in Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen zeigten keine Mutationen. Oxidative Modifikationen von DNA und Proteinen werden auch für die karzinogene Wirkung verantwortlich gemacht. Persistierender oxidativer Stress kann zur Aktivierung der Protoonkogene wie c-fos und c-jun und zur genetischen Instabilität führen (Nishigori, 2006). Weitere Untersuchungen der genomische Instabilität und der epigenetische Veränderungen sind nötig, um den molekularen Mechanismus wie DMBA und UVB-Bestrahlung die Melanomentstehung und Metastasierung in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen fördern, zu erklären.

4.3 Abwesenheit lymphozytärer Infiltrate in primär kutanen Melanomen

Weder in spontanen noch in UV-induzierten primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen konnten wir eine lymphozytäre Infiltration oder eine Induktion von T-Zell Antworten beobachten. Ein progressives Melanomwachstum ohne wesentliche Rekrutierung von Immunzellen wird jedoch in vielen gegenwärtig verfügbaren autochthonen Maus-Melanom-Modellen beschrieben. Spontane primäre Melanome von MT/Ret, N-Ras/β-catmut und Grm1 Mäuse zeigen ähnlich wie Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome kaum lymphozytäre Infiltration (von, V et al., 2005; persönliche Kommunikation L. Larue und A. Boßerhoff). Im MT/Ret Mausmodell, in dem die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret unter der Kontrolle eines Metallothioneinpromoters überexprimiert wird, ist jedoch die Induktion von Melanom-spezifischen T-Zellen während der Melanomprogression beschrieben (Umansky et al., 2008). Nach Kreuzung von MT/Ret Mäusen mit HLA-A2-transgenen Mäusen wurden auch spontane Tumor-Remissionen und Vitiligo beschrieben, die wir in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen nicht beobachten konnten (Lengagne et al., 2004; Lengagne et al., 2008). Dies liegt möglicherweise an einer unphysiologischen Expression der humanen MHC Klasse I Moleküle.

Primäre und metastasierte Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomzellen zeichnen sich durch eine geringe MHC Klasse I Expression aus. Dies erschwert die Erkennung durch T-Zellen. Die direkte Korrelation

der Intensität und Lokalisation der MHC Klasse I Expression mit einer intratumoralen T-Zell-Infiltration konnte bereits an humanen Melanomen gezeigt werden (Al-Batran et al., 2005b). In fortgeschrittenen Melanomen kann der Verlust der MHC Klasse I Expression auf verschiedenen Mechanismen beruhen, wie z.B. Mutationen des β -2-Mikroglobulin-Gens bzw. von Genloci anderer Bereiche der Antigenprozessierung. Durch Reduktion bzw. Verlust der MHC Klasse I Expression sowie durch mangelnde bzw. fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle können sich Tumorzellen der Kontrolle durch Effektorzellen entziehen (Campoli und Ferrone, 2008; Chang und Ferrone, 2007).

In TiRP Mäusen, in denen $Hras^{G12V}$ und eine Deletion von $p16^{INK4a}/p19^{Arf}$ durch eine Tamoxifen-induzierte Cre Rekombinase Aktivität spezifisch in den Melanozyten induziert werden können, treten sowohl stark pigmentierte Melanome ohne Infiltration von Immunzellen als auch (in 65% der Fälle) amelanotische Melanome mit ausgeprägter Immunzellrekrutierung auf (Huijbers et al., 2006; Soudja et al., 2010). Einige Melanome in diesen Mäusen sind aus beiden Anteilen zusammengesetzt. In $Hgf-Cdk4^{R24C}$ Mäusen haben wir ähnliche histomorphologische Bilder in nur 5% der Melanome beobachtet. Der Grund für die Entstehung der beiden Tumortypen in TiRP Mäusen ist noch nicht klar. Die unterschiedliche Verteilung der Tumortypen in $Hgf-Cdk4^{R24C}$ und TiRP Mäusen könnte darauf zurück zu führen sein, dass in TiRP Mäusen sowohl $p16^{INK4a}$ als auch $p19^{Arf}$ genetisch deletiert ist, während in $Hgf-Cdk4^{R24C}$ Melanomen nur $p16^{INK4a}$ durch die Cdk4 Mutation funktionell inaktiv ist (Ha et al., 2007). Der Tumorsuppressor $p19^{Arf}$ kann die onkogene NF κ B Transaktivierung unterdrücken (Rocha et al., 2003). Die fehlende Expression der proinflammatorischen NF κ B Ziel-Gene IL1, IL6 und Interferon γ im Tumormikromilieu deuten auf eine NF κ B Suppression hin und stellen damit einen möglichen Mechanismus da, wie spontane $Hgf-Cdk4^{R24C}$ Melanome eine Aktivierung des Immunsystems verhindern (Ng et al., 2002).

Die fehlende Induktion Melanom-spezifischer T-Zellen im $Hgf-Cdk4^{R24C}$ Modell könnte auch mit den immunsuppressiven Eigenschaften von Hgf erklärt werden. Yamamura et al. konnten zeigen das Hgf eine akute und chronische Abstoßungsreaktion in einem allogenen Herztransplantations-Mausmodell unterdrücken kann. Dabei stellten sie durch Hgf erhöhte Expressionslevel von IL-10 und Tgf- β fest, die durch Stimulation regulatorischer T-Zellen zur Toleranz beitrugen (Yamamura et al., 2004). Auch die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen in der Lunge kann durch Hgf unterdrücken werden (Yamamoto et al., 2005). In einem experimentellen Model für

Autoimmune Enzephalitis (EAE) konnte kürzlich gezeigt werden, dass Hgf die Funktion von dendritischen Zellen inhibieren, die Differenzierung von regulatorischen Zellen fördern und Oberflächenmarker der T-Zell Aktivierung herunterregulieren kann (Benkhoucha et al., 2010). Hgf-transgene Mäuse entwickeln jedoch normale Vakzin-induzierte T-Zell-Antworten (Tormo et al., 2006a). Nach intrakutaner Injektion von Methylcholanthren (MCA) entwickeln Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse wie Wildtyp Mäuse primäre Sarkome, die eine ausgeprägte Infiltration von Immunzellen zeigen. Im Tumormikromilieu unterscheiden sich die Genexpressionslevel von Hgf im Vergleich zu Melanomen nicht. Die immunsuppressive Wirkung von Hgf kann deshalb wahrscheinlich nicht die alleinige Ursache für die fehlende Immunzell-Rekrutierung in Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen darstellen.

Die Expression des transformierenden Wachstumsfaktor β (transforming growth factor Tgf- β) ist in Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen im Vergleich zu Nävus und normaler Haut erhöht. Tgf- β wird in der frühen Phase der malignen Entartung ein antiproliferativer Effekt zugeschrieben. Im fortgeschrittenen Tumorstadium fördert Tgf- β die Progression, Angiogenese und Metastasierung. Die parakrine Sekretion von Tgf- β ist an einem immunsuppressiven Mikromilieu beteiligt. Sie hemmt T-Zell Proliferation und Aktivierung sowie die Antigenpräsentation von Antigenpräsentierenden Zellen (Ikushima und Miyazono, 2010; Li et al., 2006). Bei Melanompatienten gibt es Hinweise, dass eine erhöhte Tgf- β Expression mit der Tumorprogression korreliert (Van et al., 1996). Erhöhte Plasmalevel konnten bei fortgeschrittenen Melanompatienten nachgewiesen werden (Krasagakis et al., 1998).

4.4 Immun-Escape nach adoptivem T-Zell Transfer

Die Bedeutung einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung während der natürlichen Melanomprogression wurde in dieser Arbeit in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen, die spontan ein einziges progressiv wachsendes Melanom entwickelten, experimentell untersucht. Zur Induktion einer T-Zell-Antwort gegen ein klinisch relevantes Melanomantigen wurde das in Vorarbeiten etablierte Protokoll eines adoptiven Transfers mit transgenen pmel-1 CD8⁺ Zellen in Kombination mit einer Chemotherapie und einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems angewendet (Kohlmeyer et al., 2009). Die adoptiv transferierten CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkennen spezifisch das melanosomale Protein gp100, das von Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird. Spontane Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome konnten durch die adoptiv transferierten CD8⁺ zytotoxischen

T-Zellen zerstört werden. Im Vergleich zu Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte in dieser Arbeit die Therapieantwort ohne den Einfluss von Karzinogen und dem Auftreten von multiplen Tumoren in relativ jungen Mäusen untersucht werden.

Etwa 3 Monate nach experimentell induzierter, T-Zell-vermittelter Tumordestruktion beobachteten wir in den meisten Mäusen ein Wiederauftreten primärer Melanome. Da Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse, im Vergleich zu anderen genetischen Mausmodellen (z.B. den transgenen Hras, Ret oder Grm1-Modellen), in der Regel nur ein Melanom auf der Rückenhaut entwickeln, konnte das Tumorstadium gut verfolgt werden. Diese Tatsache ermöglichte die Aussage, dass es sich bei den wieder aufgetretenen Melanomen um Lokalrezidive und keine neuen Melanome handelte. Nach kompletter Tumorregression müssen demnach Melanomzellen persistieren, die nach einer gewissen Zeit wieder zu proliferieren beginnen.

Der Großteil der Melanomrezidive waren makro- und mikroskopisch stark pigmentiert und exprimierte weiterhin melanozytäre Marker. Diese Daten sprechen gegen die Entwicklung von Antigen-Verlust-Varianten als hauptsächlichem Immune-Escape Mechanismus. Jedoch zeigten 40% der Tumore Areale von wenig pigmentierten bis amelanotischen Tumorzellen, die zum Teil von zahlreichen Immunzellen, vor allem von Gr1⁺CD11b⁺ myeloiden Zellen, infiltriert waren. Es ist beschrieben, dass diese Zellen die T-Zell Effektorfunktion unterdrücken können (Gabrilovich und Nagaraj, 2009; Nagaraj et al., 2010). Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, dass primäre Melanome trotz persistierender pmel-1 T-Zellen lokal wiederauftreten. Unsere Ergebnisse ergänzen die beschriebenen Effekte der Tumortoleranz nach adoptiv transferierten T-Zellen in TiRP Mäusen (Soudja et al., 2010). Tumor infiltrierende Gr1⁺ myeloide Suppressor Zellen wurden dort besonders in den amelanotischen Tumoren gefunden und für die unterdrückte Effektorfunktion der tumorspezifischen T-Zellen verantwortlich gemacht.

Das Auftreten von Pigmentverlust in Melanomrezidiven spricht für die Proliferation von dedifferenzierten Melanomzellen nach T-Zell-vermittelter Immunüberwachung. Selten kommt es auch spontan zum Verlust von Pigmentierung in Melanomzellen. In 3/61 primären spontanen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen konnten große Tumoreareale mit amelanotischen Tumorzellen beobachtet werden. In anderen genetischen Mausmodellen wurde ein Zusammenhang zwischen verstärktem Proliferationspotential und Verlust der Pigmentierung gefunden. In TiRP Mäusen wachsen amelanotische deutlich rascher als pigmentierte Melanome. In Tyr-ras-Mdm4^{+/-} Mäusen

steigt mit dem Pigmentverlust die Wachstumskinetik von DMBA induzierten Melanomen (Terzian et al., 2010). Auch in schnell progressiv wachsenden Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen nimmt der Anteil der wenig pigmentierten Tumorzellen deutlich zu, was für ein erhöhtes Proliferationspotential dieser Zellen spricht. Es bleibt weiter abzuklären durch welche Eigenschaften sich die beiden Zellpopulationen unterscheiden und ob die weniger differenzierten Melanomzellen aus den stärker differenzierten pigmentierten epitheloiden Tumorzellen hervorgehen und welche Plastizität diese Zellen besitzen. Durch Einzellzellanalysen könnte eine genetische Charakterisierung der beiden Zelltypen erfolgen. Eine separate Kultivierung der Zellen und Transplantationsexperimente könnten wichtige Aufschlüsse über die Plastizität der Zellen, ihre Transformations- und Metastasierungsfähigkeit geben. Die Frage, ob es eine Melanomstammzelle oder eine Melanom-initiierende Zelle gibt und ob diese direkt aus Melanozyten oder von dedifferenzierten Melanozyten oder dessen Vorläuferzellen hervorgehen, ist bis heute unklar (Sabatino et al., 2009; White und Zon, 2008). Die T-Zell vermittelte Immunüberwachung fördert die Proliferation von entdifferenzierten, wenig pigmentierten Melanomzellen und beeinflusst damit aktiv die Tumorprogression.

Durch die weitere Analyse molekularer und zellulärer Mechanismen, wie das Immunsystem die maligne Transformation und Tumorprogression beeinflusst, kann das Hgf-Cdk4^{R24C} Modell zu einem besseren Verständnis der Melanom-spezifischen Tumortoleranz und deren immuntherapeutischen Intervention beitragen.

5 Zusammenfassung

Bei Melanompatienten führen verschiedene genetische Schädigungen in Melanozyten zur Aktivierung des Ras-Raf Signaltransduktionswegs sowie zum Funktionsverlust der Tumor Suppressorgene p16^{INK4a}-Rb und/oder Arf-p53. Dadurch entstehen proliferierende, invasiv wachsende Melanomzellen, die im Verlauf in die regionalen Lymphknoten und die inneren Organe metastasieren und sich als besonders therapieresistent auszeichnen. Diese genetischen und biologischen Charakteristika werden im genetischen Hgf-Cdk4^{R24C} Maus-Modell imitiert. Die ersten beiden Ziele der Arbeit bestanden darin, die spontane und UVB-induzierte Transformation von Melanozyten in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zu untersuchen. Im dritten Ziel wurde das Wachstum spontaner primärer Melanome nach experimenteller Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung analysiert. Dabei wurde die Hypothese verfolgt, dass das zelluläre Immunsystem aktiv die natürliche Melanomprogression beeinflussen kann. Die Ergebnisse zeigten, dass das mutierte Cdk4^{R24C} Protein die Entstehung sowohl von Nävi als auch von Melanomen in Hgf Mäusen fördert. Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse entwickeln zahlreiche Nävi, einzelne nodulär wachsende Melanome und lokoregionäre sowie viszerale Metastasen. Trotz ausgeprägter Vaskularisierung wachsen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome in einem Tumormikromilieu ohne Immunzell-Infiltration. Eine einmalige neonatale UVB-Bestrahlung verstärkt die Entstehung von progressiv wachsenden, nodulären Melanomen ohne die Entstehung von Nävi zu beeinflussen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass eine UVB Bestrahlung einen Tumorsuppressor Mechanismus außer Kraft setzt, der den Ausfall der p16^{INK4a}-Cdk4^{R24C} Interaktion kompensiert. Adoptiv transferierte Melanom-spezifische T-Zellen können spontane primäre Melanome zerstören. Einige persistierende Tumorzellen entgehen jedoch der Immunzellkontrolle und führen zu einem lokalen Rezidiv, oft mit weniger pigmentierten Melanomzellen und vielen Tumor-infiltrierenden Immunzellen der myeloiden Reihe. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Proliferation von entdifferenzierten Melanomzellen in einem proinflammatorischen Tumormikromilieu die T-Zell-vermittelte Immunüberwachung aufhebt. In zukünftigen Experimenten im Hgf-Cdk4^{R24C} Melanom-Modell können einerseits die durch UV-Exposition betroffenen, p16-unabhängigen Tumorsuppressor-Mechanismen charakterisiert werden, die eine Tumorprogression und Metastasierung verhindern. Andererseits können die Mechanismen untersucht werden, wie Melanomzellen einer T-Zell-vermittelten Immunüberwachung durch Entdifferenzierung in einer entzündlichen Umgebung entkommen.

6 Literaturverzeichnis

- Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 2005; 65: 4005-4011
- Al-Batran SE, Rafiyan MR, Atmaca A, Neumann A, Karbach J, Bender A, Weidmann E, Altmannsberger HM, Knuth A, Jager E. Intratumoral T-cell infiltrates and MHC class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer Res* 2005a; 65: 3937-3941
- Al-Batran SE, Rafiyan MR, Atmaca A, Neumann A, Karbach J, Bender A, Weidmann E, Altmannsberger HM, Knuth A, Jager E. Intratumoral T-cell infiltrates and MHC class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer Res* 2005b; 65: 3937-3941
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206
- Benkhoucha M, Santiago-Raber ML, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, Lalive PH. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 6424-6429
- Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* 2003; 139: 1620-1624
- Bloom MB, Perry-Lalley D, Robbins PF, Li Y, el-Gamil M, Rosenberg SA, Yang JC. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J Exp Med* 1997; 185: 453-459
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der BP. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:175-208.: 175-208
- Boon T;Maryanski J. Tumour cell variants with increased immunogenicity obtained by mutagen treatment. *Cancer Surv* 1985; 4: 135-148
- Broome PM, Gause PR, Hyman P, Gregus J, Lloria-Prevatt M, Nagle R, Bowden GT. Induction of melanoma in TPras transgenic mice. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1747-1753
- Burnet FM. Theories of delayed hypersensitivity. *Cell Immunol* 1970; 1: 251-252
- BURNET M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957; 1: 779-786
- Campoli M;Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* 2008; 27: 5869-5885
- Cassileth BR, Temoshok L, Frederick BE, Walsh WP, Hurwitz S, Guerry D, Clark WH, Jr., DiClemente RJ, Sweet DM, Blois MS, . Patient and physician delay in melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 591-598
- Chang CC;Ferrone S. Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 227-236
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW, DePinho RA. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev* 1997; 11: 2822-2834

- Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho RA. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 1999; 400: 468-472
- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van HM. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15: 1147-1165
- Clark WH, Jr.;Tucker MA. Problems with lesions related to the development of malignant melanoma: common nevi, dysplastic nevi, malignant melanoma in situ, and radial growth phase malignant melanoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 8-14
- Cowan JM, Halaban R, Francke U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1159-1164
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4340-4346
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-2147
- Damm S, Koefinger P, Stefan M, Wels C, Mehes G, Richtig E, Kerl H, Otte M, Schaidt H. HGF-promoted motility in primary human melanocytes depends on CD44v6 regulated via NF-kappa B, Egr-1, and C/EBP-beta. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1893-1903
- Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009; 41: 544-552
- de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 2005; 7: 411-423
- Dhomen N, Reis-Filho JS, Da Rocha DS, Hayward R, Savage K, Delmas V, Larue L, Pritchard C, Marais R. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009; 15: 294-303
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994; 1: 447-456
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329-60.: 329-360
- Edwards RH, Ward MR, Wu H, Medina CA, Brose MS, Volpe P, Nussen-Lee S, Haupt HM, Martin AM, Herlyn M, Lessin SR, Weber BL. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 2004; 41: 270-272
- Ferguson B, Konrad MH, Handoko HY, Khosrotehrani K, Beermann F, Hacker E, Peter SH, Bosenberg M, Walker GJ. Differential roles of the pRb and Arf/p53 pathways in murine naevus and melanoma genesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 771-780
- Fidler IJ;Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 1199-1202

- Gabrilovich DI;Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 162-174
- Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2010; 46: 270-283
- Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340: 1341-1348
- Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, Westmoreland S, Haluska FS, Hinds PW, Haluska FG. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 2009; 28: 2289-2298
- Ha L, Ichikawa T, Anver M, Dickins R, Lowe S, Sharpless NE, Krimpenfort P, DePinho RA, Bennett DC, Sviderskaya EV, Merlino G. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10968-10973
- Hacker E, Irwin N, Muller HK, Powell MB, Kay G, Hayward N, Walker G. Neonatal ultraviolet radiation exposure is critical for malignant melanoma induction in pigmented Tpr^{as} transgenic mice. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1074-1077
- Hacker E, Muller HK, Irwin N, Gabrielli B, Lincoln D, Pavey S, Powell MB, Malumbres M, Barbacid M, Hayward N, Walker G. Spontaneous and UV radiation-induced multiple metastatic melanomas in Cdk4^{R24C/R24C}/Tpr^{as} mice. *Cancer Res* 2006; 66: 2946-2952
- Halaban R, Rubin JS, Funasaka Y, Cobb M, Boulton T, Faletto D, Rosen E, Chan A, Yoko K, White W, . Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells. *Oncogene* 1992; 7: 2195-2206
- Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-259
- Hirobe T. Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histol Histopathol* 1995; 10: 223-237
- Huijbers IJ, Krimpenfort P, Chomez P, van d, V, Song JY, Inderberg-Suso EM, Schmitt-Verhulst AM, Berns A, Van den Eynde BJ. An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen. *Cancer Res* 2006; 66: 3278-3286
- Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA. Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 886-888
- Ikushima H;Miyazono K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 415-424
- Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* 2009; 19: 275-282
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8292-8297
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7556-7561

- Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, Iwamoto T, Suzuki H, Nakashima I. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 1998; 17: 1885-1888
- Klein G;Klein E. Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 2121-2125
- Kohlmeyer J, Cron M, Landsberg J, Bald T, Renn M, Mikus S, Bondong S, Wikasari D, Gaffal E, Hartmann G, Tuting T. Complete Regression of Advanced Primary and Metastatic Mouse Melanomas following Combination Chemoimmunotherapy. *Cancer Res* 2009;
- Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 1998; 77: 1492-1494
- Le Gal FA, Avril MF, Bosq J, Lefebvre P, Deschemin JC, Andrieu M, Dore MX, Guillet JG. Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1464-1470
- Lengagne R, Graff-Dubois S, Garcette M, Renia L, Kato M, Guillet JG, Engelhard VH, Avril MF, Abastado JP, Prevost-Blondel A. Distinct role for CD8 T cells toward cutaneous tumors and visceral metastases. *J Immunol* 2008; 180: 130-137
- Lengagne R, Le Gal FA, Garcette M, Fiette L, Ave P, Kato M, Briand JP, Massot C, Nakashima I, Renia L, Guillet JG, Prevost-Blondel A. Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res* 2004; 64: 1496-1501
- Li G, Schaidt H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 2001; 20: 8125-8135
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006; 25: 455-471
- Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1878-1890
- Matsumura Y;Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195: 298-308
- Maun HR, Kirchhofer D, Lazarus RA. Pseudo-active sites of protease domains: HGF/Met and Sonic hedgehog signaling in cancer. *Biol Chem* 2010; 391: 881-892
- Mihm MC, Jr., Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996; 74: 43-47
- Miller AJ;Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355: 51-65
- Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2010; 184: 3106-3116

- Natali PG, Nicotra MR, Di Renzo MF, Prat M, Bigotti A, Cavaliere R, Comoglio PM. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer* 1993; 68: 746-750
- Ng CS, Novick AC, Tannenbaum CS, Bukowski RM, Finke JH. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NFkappaB suppression. *Urology* 2002; 59: 9-14
- Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5: 208-214
- Noonan FP, Otsuka T, Bang S, Anver MR, Merlino G. Accelerated ultraviolet radiation-induced carcinogenesis in hepatocyte growth factor/scatter factor transgenic mice. *Cancer Res* 2000; 60: 3738-3743
- Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, De Fabo EC, Merlino G. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 2001; 413: 271-272
- Oliveria SA, Christos PJ, Halpern AC, Fine JA, Barnhill RL, Berwick M. Evaluation of factors associated with skin self-examination. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 971-978
- Oliveria SA, Saraiya M, Geller AC, Heneghan MK, Jorgensen C. Sun exposure and risk of melanoma. *Arch Dis Child* 2006; 91: 131-138
- Overwijk WW, Lee DS, Surman DR, Irvine KR, Touloukian CE, Chan CC, Carroll MW, Moss B, Rosenberg SA, Restifo NP. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2982-2987
- Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Antony PA, Spiess PJ, Palmer DC, Heimann DM, Klebanoff CA, Yu Z, Hwang LN, Feigenbaum L, Kruisbeek AM, Rosenberg SA, Restifo NP. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003; 198: 569-580
- Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, Namkoong J, Martino JJ, Koganti A, Zhu H, Robbins C, Makalowska I, Shin SS, Marin Y, Roberts KG, Yudt LM, Chen A, Cheng J, Incao A, Pinkett HW, Graham CL, Dunn K, Crespo-Carbone SM, Mackason KR, Ryan KB, Sinsimer D, Goydos J, Reuhl KR, Eckhaus M, Meltzer PS, Pavan WJ, Trent JM, Chen S. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet* 2003; 34: 108-112
- Powell MB, Hyman P, Bell OD, Balmain A, Brown K, Alberts D, Bowden GT. Hyperpigmentation and melanocytic hyperplasia in transgenic mice expressing the human T24 Ha-ras gene regulated by a mouse tyrosinase promoter. *Mol Carcinog* 1995; 12: 82-90
- Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986; 322: 78-80
- Recio JA, Noonan FP, Takayama H, Anver MR, Duray P, Rush WL, Lindner G, De Fabo EC, DePinho RA, Merlino G. Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 6724-6730
- Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 175-186
- Rocha S, Campbell KJ, Perkins ND. p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Mol Cell* 2003; 12: 15-25

- Sabatino M, Stroncek DF, Klein H, Marincola FM, Wang E. Stem cells in melanoma development. *Cancer Lett* 2009; 279: 119-125
- Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85: 27-37
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-1111
- Shao W, Jerva LF, West J, Lolis E, Schweitzer BI. Solution structure of murine macrophage inflammatory protein-2. *Biochemistry* 1998; 37: 8303-8313
- Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001; 413: 86-91
- Sotillo R, Garcia JF, Ortega S, Martin J, Dubus P, Barbacid M, Malumbres M. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13312-13317
- Soudja SM, Wehbe M, Mas A, Chasson L, de Tenbossche CP, Huijbers I, Van den EB, Schmitt-Verhulst AM. Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice. *Cancer Res* 2010; 70: 3515-3525
- Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombled J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de PB. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 209-216
- Steitz J, Bruck J, Gambotto A, Knop J, Tuting T. Genetic immunization with a melanocytic self-antigen linked to foreign helper sequences breaks tolerance and induces autoimmunity and tumor immunity. *Gene Ther* 2002; 9: 208-213
- Steitz J, Buchs S, Tormo D, Ferrer A, Wenzel J, Huber C, Wolfel T, Barbacid M, Malumbres M, Tuting T. Evaluation of genetic melanoma vaccines in cdk4-mutant mice provides evidence for immunological tolerance against autochthonous melanomas in the skin. *Int J Cancer* 2006; 118: 373-380
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17: 5001-5014
- Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 2002; 196: 129-134
- Stutman O;Shen FW. H-2 restriction and non-restriction of T-cell-mediated cytotoxicity against mouse mammary tumour targets. *Nature* 1978; 276: 181-182
- Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 869-875
- Terzian T, Torchia EC, Dai D, Robinson SE, Murao K, Stiegmann RA, Gonzalez V, Boyle GM, Powell MB, Pollock PM, Lozano G, Robinson WA, Roop DR, Box NF. p53 Prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 781-794

- Tormo D, Ferrer A, Bosch P, Gaffal E, Basner-Tschakarjan E, Wenzel J, Tuting T. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res* 2006a; 66: 5427-5435
- Tormo D, Ferrer A, Gaffal E, Wenzel J, Basner-Tschakarjan E, Steitz J, Heukamp LC, Gutgemann I, Buettner R, Malumbres M, Barbacid M, Merlino G, Tuting T. Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am J Pathol* 2006b; 169: 665-672
- Ueda Y;Richmond A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res* 2006; 19: 112-124
- Umansky V, Abschuetz O, Osen W, Ramacher M, Zhao F, Kato M, Schadendorf D. Melanoma-specific memory T cells are functionally active in Ret transgenic mice without macroscopic tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 9451-9458
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den EB, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647
- Van BP, Rodeck U, Nuamah I, Halpern AC, Elder DE. Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. *Am J Pathol* 1996; 148: 1887-1894
- von Thaler AK, Kamenisch Y, Berneburg M. The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp Dermatol* 2010; 19: 81-88
- von F, V, Cordoba F, Weissenberger J, Vallan C, Kato M, Nakashima I, Braathen LR, Weis J. Interleukin-6 gene ablation in a transgenic mouse model of malignant skin melanoma. *Am J Pathol* 2005; 166: 831-841
- Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22: 157-163
- White RM;Zon LI. Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 242-252
- Whiteman D;Green A. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 341: 766-767
- Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De PE, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; 269: 1281-1284
- Wolfel T, Klehmann E, Muller C, Schutt KH, Meyer zum Buschenfelde KH, Knuth A. Lysis of human melanoma cells by autologous cytolytic T cell clones. Identification of human histocompatibility leukocyte antigen A2 as a restriction element for three different antigens. *J Exp Med* 1989; 170: 797-810
- Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, Akashima T, Fujimori M, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Suzuki J, Amano J, Isobe M. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 2004; 110: 1650-1657
- Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, Puchta U, Reckwerth A, Rutten A, Mentzel T, Hugel H, Hantschke M, Schmid-Wendtner MH, Kutzner H, Sander CA. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1160-1162

Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12: 97-99

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tüting für seine unermüdliche Unterstützung und Betreuung der vorgelegten Arbeit sowie seine Energie und Motivation mich stets zum kritischen Denken anzuregen und in die Welt der Wissenschaft einzuführen. Er hat es mir ermöglicht meine naturwissenschaftliche Begeisterung weiter zu entwickeln und auszuleben. Ich freue mich auf eine weitere kreative Zusammenarbeit im „Fliegenzimmer“.

Diese Arbeit wäre ohne die großartige Unterstützung und Zusammenarbeit der gesamten Arbeitsgruppe für experimentelle Dermatologie undenkbar gewesen. Evelyn Gaffal möchte ich danken für die exzellente und geduldige Einarbeitungszeit im Tierstall und in der Histopathologie sowie für die emotionale Begleitung über die letzten Jahre. Eine besondere Freude war es, mich gemeinsam mit Judith Kohlmeyer im Labor für Experimentelle Dermatologie etablieren zu können. Ich danke ihr für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und vor allem dafür, dass sie die Mäuse während meines viermonatigen Aufenthaltes in den USA und in der Examenszeit zusammen mit Mira Cron und Sandra Mikus versorgt und therapiert hat. Sandra Mikus danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit von Anfang an. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Alexander Sporleder danke ich für seine unglaubliche Geduld und permanente Unterstützung mich theoretisch und praktisch in die Welt der Molekularbiologie einzuführen, mich bei allen Computer-Problemen rund-um-die-Uhr zu beraten und ganz besonders für die wunderbare Freundschaft, die sich in den letzten Jahren entwickelt hat. Marcel Renn und Tobias Bald danke ich für all die kritischen Anmerkungen und praktischen Hilfestellungen im Labor sowie für ihre Toleranz und Geduld einen Mediziner die „Welt der Biomediziner“ näher zu bringen. Danke an Sarah Gerdson und Katharina Zeden für die schöne Zusammenarbeit besonders in der Anfangszeit und für eure treue Freundschaft. Jörg Wenzel danke ich für die Unterstützung in der Dermatohistopathologie und für all die guten Ratschläge.

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die immer für mich da waren, mit mir diskutiert haben und alle einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben: Jens Wohlmann, Christa Paraknewitz, Harald Voth, Lin Ehler, Regina Steuder, Philipp Jansen, Eva Ratering, Thorsten Hornung, Sandra Ferring-Schmitt, Sabine Zahn, Sibille Wiesel, Prof. Ralf Bauer, Friederike Lehnen, Andrea Schmischke, Petra Gehards, Claudia Habenicht, Christian Busch, Tobias Sinnberg.

Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern Renate und Gerd, meine Geschwister Marie und Richard und meine Omi Annemarie von Grolman, an meine Freunde und Verwandten sowie meinen Patenonkel Burkhard Asbeck und seine Frau Elke Asbeck, die in den letzten Jahren viel Verständnis aufbringen und immer wieder auf meine Anwesenheit verzichten mussten. Danke für eure unermüdliche Unterstützung! Es ist so schön, dass es Euch alle gibt!

Publikationen, Vorträge und Preise

Originalarbeiten

2011

*Gaffal E and ***Landsberg J** (*contributed equally) et al. (2011). Neonatal UVB exposure accelerates melanoma growth and enhances distant metastases in Hgf-Cdk4^{R24C} C57BL/ mice.

International Journal of Cancer (Int J Cancer.). 2011 Jan 4. [Epub ahead of print]

2010

Landsberg J, Gaffal E, Cron M, Kohlmeyer J, Renn M, Tüting T. (2010). Autochthonous primary and metastatic melanomas in Hgf-Cdk4^{R24C} mice evade T-cell mediated immunsurveillance.

Pigment Cell Melanoma Research (Pigment Cell Melanoma Res.). 2010 Oct;23(5):649-60. Epub 2010 Jul 23.

Schultz J, Koczan D, Schmitz U, Ibrahim SM, Pilch D, **Landsberg J**, Kunz M. Tumor-promoting role of signal transducer and activator of transcription (Stat)1 in late-stage melanoma growth.

Clinical and Experimental Metastasis (Clin Exp Metastasis.). 2010 Mar;27(3):133-40. Epub 2010 Feb 24.

2009

Kohlmeyer J, Cron M, **Landsberg J**, Bald T, Renn M, Mikus S, Bondong S, Wikasari D, Gaffal E, Hartmann G, Tüting T.; et al.(2009). Complete regression of advanced primary and metastatic mouse melanomas following combination chemoimmunotherapy.

Cancer Research (Cancer Res.). 69, 6265-6274

2008

Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, **Landsberg J**, Hellmuth J, Schmidt A, Anz D, Bscheider M, Schwerdt T, Berking C, Bourquin C, Kalinke U, Kremmer E, Kato H, Akira S, Meyers R, Häcker G, Neuenhahn M, Busch D, Ruland J, Rothenfusser S, Prinz M, Hornung V, Endres S, Tüting T, Hartmann G. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma.

Nature Medicine (Nat Med.). 2008 Nov;14(11):1256-63. Epub 2008 Nov 2.

Abstracts und Poster

1. **Landsberg J., Renn M**, Kohlmeyer J., Cron M., Mikus S., Bald T., **Tüting T.** T cell mediated immune surveillance promotes melanoma cell dedifferentiation in the genetically engineered Hgf-Cdk4^{R24C} mouse model.
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2011, Tübingen (veröffentlicht in *Experimental Dermatology*)
2. Kohlmeyer J., Landsberg J., Renn M., Pflitsch S., Bald T., Zigrino P., Gaffal E., Mauch C., **Tüting T.** Constitutive secretion of proinflammatory chemokines is associated with aggressive and metastatic growth of Hgf-Cdk4^{R24C} mouse melanoma cell lines *in vitro* and *in vivo*.

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2011, Tübingen (veröffentlicht in Experimental Dermatology)

Renn M., Bald T., Sporleder A., Landsberg J., **Tüting T.** Targeting of cytosolic pattern recognition receptors augments the efficiency of adoptive T-cell immunotherapy in a new mouse melanoma model.

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2011, Tübingen (veröffentlicht in Experimental Dermatology)

3. **Landsberg J**, Gaffal E, Cron M, Kohlmeyer J, Renn M, Tüting T
Autochthonous primary and metastatic melanomas in Hgf-Cdk4 mice evade T cell-mediated immune surveillance.
Society for Melanoma Research (SMR), November 2010, Sydney, Australien (veröffentlicht in Pigment Cell Melanoma Research)
4. **Landsberg J**, Gaffal E, Bald T, Kohlmeyer J, Sporleder A, Zeden K, Wenzel J, Mauch C, Tüting T
Primary cutaneous melanomas in genetically engineered mice imitate the biology of nodular pigmented melanoma without lymphocytic infiltration in man
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2010, Lübeck (veröffentlicht in Experimental Dermatology)
5. **Landsberg J**, Gaffal E, Bald T, Mikus S, Kohlmeyer J, Tüting T
Neonatal UV irradiation promotes multistage melanomagenesis in the Hgf-Cdk4^{R24C} C57BL/6 mouse tumor model
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2010, Lübeck (veröffentlicht in Experimental Dermatology)
6. Bald T, **Landsberg J**, Mikus S, Tüting T
Induction of rapidly growing primary cutaneous melanomas in adult Hgf-Cdk4^{R24C} mice following a single epicutaneous carcinogen application
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2010, Lübeck (veröffentlicht in Experimental Dermatology)
7. **Landsberg J**, Gaffal E, Bald T, Kohlmeyer J, Wenzel J, Tüting T
Sporadic and UV-inducible primary melanomas in Hgf-Cdk4^{R24C} mice imitate the biology of a subset of pigmented nodular melanoma in man
Society for Melanoma Research (SMR), November 2009, Boston, USA (veröffentlicht in Pigment Cell Melanoma Research)
8. Kohlmeyer J, Cron M, **Landsberg J**, Bald T, Renn M, Mikus S, Bondong S, Wikasari D, Gaffal E, Hartmann G, Tüting T
Complete regression of advanced primary and metastatic mouse melanomas following combination chemo-immunotherapy
Society for Melanoma Research (SMR), November 2009, Boston, USA (veröffentlicht in Pigment Cell Melanoma Research)
9. **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Gaffal E, Cron M, Bald T, Mikus M, Renn M, Wenzel J, Hartmann G, Tüting T

- Komplette Regression von primär kutanen und spontan metastasierenden Melanomen im Hgf-Cdk4^{R24C} Mausmodell durch eine kombinierte Chemoimmuntherapie.
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie, ADO September 2009, Köln
(veröffentlicht im Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft JDDG)
10. **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Gaffal E, Cron M, Bald T, Mikus M, Renn M, Wenzel J, Hartmann G, Tüting T
 Primary cutaneous melanomas in Hgf-Cdk4 mice evade innate and adaptive immune defense but can be eradicated by combination chemo-immunotherapy
Association for Cancer Immunotherapy, CIMT Juni 2009, Mainz
 11. **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Gaffal E, Bald T, M, Wenzel J, Tüting T
 Primary melanomas in Hgf-Cdk4 mice are highly vascularized and grow progressively without prominent tumor-associated inflammation and immune cell recruitment
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2009, Heidelberg
(veröffentlicht in Experimental Dermatology)
 12. **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Gaffal E, Cron M, Bald T, Mikus M, Renn M, Wenzel J, Hartmann G, Tüting T
 Primary cutaneous melanomas in Hgf-Cdk4 mice avoid recognition and destruction by the cellular immune system
Keystone Meeting Februar 2009, Snowbird, USA
 13. **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Gaffal E, Tüting T
 Macroscopic and microscopic characterization of spontaneous and UV induced melanomas in the skin of Hgf-Cdk4 mice
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2008, Erlangen
(veröffentlicht in Experimental Dermatology)
 14. **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Gaffal E, Tüting T
 Role of the immune system in the pathogenesis of malignant melanoma in a new genetic mouse model
Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Februar 2008, Erlangen
(veröffentlicht in Experimental Dermatology)
 15. Vujanovic L, Newton S, **Landsberg J**, Nikola L, Butterfield LH
 Cross-Talk between NK Cells and Adenovirally-Engineered Dendritic Cell Vaccines
Federation of American Societies for Experimental Biology Meeting, FAESB 2008, Los Angeles, USA (veröffentlicht im FAESB Journal)
 16. Gaffal E, **Landsberg J**, Kohlmeyer J, Tormo D, Wenzel J, Merlino G, Tüting T
 Mutant Cdk4 increases the penetrance and decreases the latency of UV-induced, pigmented, metastasizing melanoma in the skin of C57BL/6 Hgf mice
Society for Investigative Dermatology, SID Mai 2007, Los Angeles, USA (veröffentlicht im Journal of Investigative Dermatology)

Vorträge

- 2011 T cell mediated immune surveillance promotes melanoma cell dedifferentiation in the genetically engineered Hgf-Cdk4^{R24C} mouse model.
Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung ADF, Tübingen
- 2010 Autochthonous primary and metastatic melanomas in Hgf-Cdk4 mice evade T cell-mediated immune surveillance.
International Melanoma Meeting 2010 (Society of Melanoma Research), Sydney, Australien
- 2009 Primary cutaneous melanomas in Hgf-Cdk4 mice avoid recognition and destruction by the cellular immune system
Keystone Meeting: Mobilizing Cellular Immunity for Cancer Therapy, Snowbird, USA
- Primary cutaneous melanomas in Hgf-Cdk4 mice evade innate and adaptive immune defense but can be eradicated by combination chemo-immunotherapy
Annual Meeting of the association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 2009, Mainz
- Targeting antiviral pattern recognition receptors in tumour and immune cells for melanoma therapy
Annual Meeting of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), Berlin

Preise

- 2011 Dermato-Onkologie-Nachwuchspreis der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)
- 2010 Posterpreis der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF): Neonatal UV irradiation promotes multistage melanomagenesis in the Hgf-Cdk4^{R24C} C57BL/6 mouse tumor model
- 2009 Posterpreis der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO): Komplette Regression von primär kutanen und spontan metastasierenden Melanomen im Hgf-Cdk4^{R24C} Mausmodell durch eine kombinierte Chemoimmuntherapie.